

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :

**2 782 734**

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national :

**98 10841**

⑤1 Int Cl<sup>7</sup> : C 12 N 15/89, C 12 N 15/86, 15/11, A 01 K 67/027

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

**A1**

②2 Date de dépôt : 28.08.98.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 03.03.00 Bulletin 00/09.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE  
ET DE LA RECHERCHE MEDICALE INSERM Etablis-  
sement public à caractère scientifique et technologique  
— FR.

⑦2 Inventeur(s) : CUZIN FRANCOIS, RASSOULZADE-  
GAN MINOO et VIDAL FREDERIQUE.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤4 PROCÉDE POUR REMODELER LE GENOME D'UN ANIMAL PAR TRANSFERT ZYGOTIQUE D'UNE  
RECOMBINASE SPECIFIQUE DE SITE.

⑤7 La présente invention concerne un procédé pour  
transférer dans un oocyte d'un mammifère une protéine  
d'intérêt, notamment une recombinaison spécifique de site,  
sous sa forme active. Ladite recombinaison est exprimée  
dans les cellules germinales mâles sous le contrôle d'un  
promoteur spécifique et reste associées à la chromatine des  
spermatozoïdes. Ce procédé est particulièrement utile pour  
remodeler le génome d'un animal, par exemple pour insérer  
une séquence étrangère dans le génome d'un animal, et  
pour remplacer une séquence par une autre. Dans le cas où  
ledit promoteur est le promoteur Sycpl, un mode d'applica-  
tion permet de réaliser des recombinaisons entre chromo-  
somes paternels et maternels. La présente invention porte  
également sur les animaux susceptibles d'être obtenus par  
ce procédé, et sur l'utilisation de ces animaux transgêni-  
ques dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques, et  
agro-alimentaire.

FR 2 782 734 - A1



5

La présente invention concerne un procédé pour transférer dans un oocyte d'un mammifère une protéine d'intérêt, notamment une recombinaise spécifique de site, sous sa forme active. Ladite recombinaise est exprimée dans les cellules germinales mâles sous le contrôle d'un promoteur spécifique et reste associées à la chromatine des spermatozoïdes. Ce procédé est particulièrement utile pour remodeler le génome d'un animal, par exemple pour insérer une séquence étrangère dans le génome d'un animal, et pour remplacer une séquence par une autre. Dans le cas où ledit promoteur est le promoteur Sycp1, un mode d'application permet de réaliser des recombinaisons entre chromosomes paternels et maternels. La présente invention porte également sur les animaux susceptibles d'être obtenus par ce procédé, et sur l'utilisation de ces animaux transgéniques dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques, et agro-alimentaire.

Le procédé de recombinaison site spécifique représente un outil puissant pour effectuer des modifications prédéterminées dans le génome des animaux. Plusieurs enzymes de recombinaison, dont la recombinaise Cre du bactériophage P1 (Sauer & Henderson, 1989, 1990 et Porter, 1998) catalysent un événement de recombinaison entre deux séquences désoxyribonucléotidiques double brin définies (séquence cible LoxP pour l'enzyme Cre). Ces opérations de recombinaison par Cre ont été réalisées dans des cellules en culture (Sauer et Henderson, 1990) et dans les cellules des plantes (Albert et al. 1995), mais pas sur la lignée germinale d'un animal.

La réaction de recombinaison a été le plus souvent utilisée pour la délétion ciblée "knock-out" de régions génomiques spécifiques dites « floxées » par recombinaison intramoléculaire entre deux sites LoxP d'une même molécule. En particulier, des délétions dans des types cellulaires déterminés ont été réalisées à partir de diverses constructions génétiques permettant de faire exprimer spécifiquement la recombinaise Cre (Brocard et al. 1997). L'intégration ciblée "knock-in" pourrait représenter une possible application de la recombinaison spécifique de site et serait d'un grand intérêt, mais certaines limitations n'ont pas permis un tel développement. De manière générale, une recombinaise pourrait catalyser une recombinaison intermoléculaire entre deux molécules d'ADN portant chacune un site spécifique (ou site de recombinaison) et servirait à l'intégration d'un ADN hétérologue (introduit dans la cellule) en un site défini (une région du génome de la cellule).

L'application à la lignée germinale d'un mammifère pourrait être envisagée chez les mammifères par les méthodes actuellement disponibles, mais l'opération exigerait une suite de longues étapes techniquement difficiles, impliquant la sélection de clones recombinants dans des cellules ES en culture, l'obtention de chimères germinales, et une série de croisements avant l'obtention d'une lignée recombinante stable. D'une part, le temps requis pour l'ensemble de ces opérations se chiffrerait en mois, sinon en années et le rendement serait faible. D'autre part, la sélection des clones recombinants exigerait l'introduction de gènes de résistance à des antibiotiques. Ces sélections pourraient introduire des distorsions imprévisibles de l'expression génétique.

En l'état actuel de la technique, les mutations introduites par recombinaison homologue ou excision sont fréquemment létales pour les animaux. De ce fait, l'effet de ces mutations dans la lignée germinale mâle ne peut être évalué  
5 puisque le processus cyclique de la spermatogenèse implique un nombre de gènes de régulation qui exercent des fonctions critiques dans d'autres organes. Un exemple de cette situation a été décrit pour le gène Brcal (Gowen et al. 1996, Zabludoff et al. 1996). Cette limitation peut être surmontée en  
10 établissant un contrôle spatial et temporel de l'expression de la recombinaison. L'utilisation de promoteurs de tissus spécifiques et de promoteurs inductibles, l'utilisation de vecteurs adénoviraux et de formes de la recombinaison activées par des hormones ont été considérées pour palier ce problème  
15 (Akagi et al. 1997, Brocard et al. 1997, Gu et al. 1994, Kühn et al. 1995, Porter, 1998, Wagner et al. 1997).

Ces problèmes sont résolus par la présente invention puisque la recombinaison, n'est exprimée que dans les cellules  
20 germinales mâles. De manière inattendue, elle reste associée à la chromatine des spermatozoïdes et est transférée par les spermatozoïdes dans les oocytes sous forme active après la fécondation. Ceci permet in fine de remodeler le génome.

25 Une application supplémentaire pourrait être la recombinaison méiotique homologue spécifique de site entre chromosomes paternels et maternels. Ceci exigerait la présence de l'enzyme pendant la première division de méiose (essentiellement au stade pachytène), ce qui est précisément le  
30 cas dans les expériences menant à la présente invention.

La méiose réduit la taille du génome et génère une diversité génétique par recombinaison homologue, tout en

maintenant l'intégrité génétique par un processus de réparation. Il existe peu de connaissances concernant les processus de régulation transcriptionnelle lors des premiers stades de la méiose. Cependant, des études avec des souris transgéniques ont conduit récemment à l'identification de promoteurs spécifiques des cellules mâles, par exemple HSP70-2 (Dix et al. 1996), Pdha-2 (Iannello et al. 1997), Pkg2 (Robinson et al. 1989), Tcp-10bt (Ewulonu et al. 1993) et Hox-a.4 (Berhinger, 1993). L'adressage de l'expression de Cre vers la lignée germinale, publié dans O'Gorman et al. 1997, utilise le promoteur de la protamine Prm1, qui est actif seulement après la méiose.

Le gène Sycp1 a été identifié, cloné et localisé sur le chromosome 3 de la souris (Sage et al. 1997). La protéine est un composant majeur de l'élément central du complexe synaptonemal (Meuwissen et al. 1992). Elle est présente exclusivement pendant la méiose du mâle et de la femelle du début du stade zygotène jusqu'au stade diplotène (Meuwissen et al. 1992, Heyting et al. 1989, Offenberger et al. 1991, Dietrich et al. 1992, Moens et al. 1992, Dobson et al. 1994). L'expression concomitante de l'ARNm et de la protéine montre que la régulation de l'expression se situe au niveau transcriptionnel (Meuwissen et al. 1992).

Contrairement aux promoteurs ci-dessus mentionnés, qui sont exprimés à des stades relativement tardifs de la différenciation germinale, Sycp1 présente l'intérêt d'être exprimé lors de la phase précoce de la méiose des spermatocytes. Il a été nécessaire d'identifier et de sélectionner les éléments responsables de l'expression spécifique de Sycp1. Vu qu'il n'a pas été possible d'établir une lignée cellulaire qui exprime le gène endogène, des

expériences à partir de souris transgéniques ont été effectuées. Ainsi, on a trouvé qu'une région du promoteur de Sycp1 de souris, localisée jusqu'à 260 pb en amont du site d'initiation de la transcription du gène Sycp1, est non seulement suffisante pour diriger l'expression d'un transgène pendant la période initiale de la méiose chez le mâle, mais est aussi la plus efficace chez les mâles sans pour autant être active dans l'ovaire. Cette région de Sycp1 se trouve donc utile pour la recombinaison méiotique entre des sites LoxP soit portés sur le même chromosome, soit à des localisations distinctes des chromosomes paternels et maternels.

L'ensemble des opérations nécessaires à la mise en oeuvre de la présente invention n'exige qu'une série de microinjections et réimplantations, technique aujourd'hui de routine, sur un nombre limité d'oeufs fécondés (une portée est le plus souvent suffisante). Contrairement à une opération menée à partir de cellules ES, la procédure présentée n'implique pas l'utilisation de systèmes de sélection, et le temps nécessaire à l'obtention de la souris recombinante est de quelques semaines, ce qui est considérablement plus rapide que pour la sélection de recombinants. En outre, les animaux transgéniques obtenus et leurs descendance sont totalement stables.

Ainsi, aucun des documents de la technique antérieure ne décrit, ni ne suggère la présente invention telle que définie ci-dessous.

### 30 Description

La présente invention concerne un procédé pour transférer dans un oocyte une protéine d'intérêt, qui possède une forte

affinité pour l'ADN, sous sa forme active. Ce procédé consiste à faire exprimer dans les cellules germinales mâles une protéine possédant une forte affinité pour l'ADN, ladite protéine restant associée à la chromatine des spermatozoïdes, à  
5 fertiliser des oocytes et à transférer la protéine par lesdits spermatozoïdes. La protéine est ensuite libérée sous sa forme active lors de la décondensation de la chromatine après la fécondation.

Un mode d'application avantageux de ce procédé réside dans le  
10 transfert d'une recombinaise spécifique de site, notamment Cre.

Ainsi, la présente invention concerne un procédé d'insertion d'une séquence étrangère dans le génome d'un animal comprenant les étapes suivantes :

15

a) expression d'une recombinaise spécifique de site dans les spermatocytes d'un mâle portant au moins un site spécifique dans son génome, ladite recombinaise restant associée à la chromatine des spermatozoïdes.

20

b) Fertilisation des oocytes et transfert de la recombinaise par lesdits spermatozoïdes.

25

c) Microinjection d'un ADN recombinant possédant la structure « site spécifique-séquence étrangère » dans le pronucleus mâle après fécondation.

30

d) Insertion du transgène d'intérêt au site spécifique dans le génome de l'embryon au stade 1 cellule, catalysée par la recombinaise libérée lors de la décondensation de la chromatine du spermatozoïde.

Dans ce procédé, ladite séquence étrangère comporte un gène d'intérêt, à exprimer sous le contrôle d'un promoteur éventuellement tissu(s) spécifique. Le gène d'intérêt peut posséder en outre un élément accepteur d'épissage (SA), une  
5 séquence IRES (Internal Ribosome Entry Site) et/ou un signal de polyadénylation (par exemple AATAAA) et le gène d'intérêt peut coder pour une protéine d'intérêt ou être un gène rapporteur permettant d'identifier des promoteurs tissus spécifiques.

10 Dans un autre aspect, l'invention a pour objet un procédé de remplacement d'une séquence X par une séquence Y dans le génome d'un animal qui consiste à croiser un mâle de génotype «site spécifique-séquence X- site spécifique » dont les spermatocytes expriment une recombinaise spécifique de site, ladite  
15 recombinaise restant associée à la chromatine des spermatozoïdes, avec une femelle possédant la structure « site spécifique -séquence Y- site spécifique » dans son génome, ladite recombinaise catalysant l'excision de la séquence X pendant la méiose des spermatocytes et l'intégration de la  
20 séquence Y dans le site spécifique juste après fécondation des oocytes. Bien évidemment, ce procédé peut être aussi réalisé in vitro en microinjectant une séquence comprenant la structure « site spécifique -séquence Y- site spécifique » dans l'oocyte fertilisé. On entend par séquence X ou séquence Y, n'importe  
25 quelle séquence codante ou non codante.

Selon les procédés évoqués supra et pour la suite de la description de l'invention, ladite recombinaise peut être Cre et ledit site spécifique un site LoxP et être exprimée sous le  
30 contrôle d'un promoteur permettant une expression efficace dans les cellules germinales d'un mammifère. N'importe quelle protéine Cre, ses mutants, et variants, et n'importe quel mutant et variant de la séquence LoxP, peuvent être utilisés dans le cadre de la présente invention. Cre, bien connue de



l'homme du métier, a été décrite notamment dans EP 300 422 (page 4 lignes 5-33) et EP 220 009 (page 3 lignes 31-39), incorporés dans la description par référence. De nombreux plasmides contenant la séquence de Cre y sont divulgués et ont  
5 été déposés à l'American Tissue Culture Collection tels que BSY90 (n° d'accension ATCC 53255) et pBS39 (n° d'accension ATCC 20772). La séquence de Cre peut être isolée de pBS39 par les enzymes de restriction XhoI et SalI. D'autres systèmes Recombinase/site spécifique peuvent être utilisés dans le cadre  
10 de la présente invention. On peut citer notamment le système FLP/FRT dérivé de *Saccharomyces cerevisiae*, le système S/RS de *Zygosaccharomyces rouxii* et le système Gin/gix dérivé du bactériophage Mu qui sont décrits dans EP 814 165, incorporé dans la description par référence.

15

Parmi les promoteurs qui permettent une expression efficace dans les cellules germinales d'un mammifère, on retient notamment les promoteurs Sycp1 (N° d'accension dans les banques  
20 de données U 35665), Tcp10 (M 84175), Pdk-2, HSP-70-2, Pdha-2 ou Prml (X 07626), ou au moins une région de ces promoteurs. Par exemple, ledit promoteur peut comporter au moins une séquence ayant au moins 80 % d'identité avec la région -260/+5 (SEQ ID n° 1) du promoteur Sycp1 de souris. Cette région est  
25 suffisante pour induire efficacement l'expression d'un gène d'intérêt spécifiquement lors de la méiose précoce des spermatocytes d'un mammifère.

Des exemples de promoteurs pouvant servir pour  
30 l'accomplissement de la présente invention sont illustrés au tableau 1 ci-dessous. Les références du tableau sont incorporées par référence dans la description.

**Tableau 1 : Promoteurs actifs à différents stades de la spermatogenèse.**

Gène	Promoteur Minimal défini	Spécificité d'expression	Références
EF-1alpha	[-1200 ; -1]	Spermatogonies	(Furuchi, 1996)
IAP	LTR	Spermatogonies	(Dupressoir, 1996)
FRM1'	[-2800 ; -1]	Spermatogonies	(Hergersberg, 1995)
Pdha-2	[-187, -1]	Spermatocytes précoces	(Iannello, 1997)
Hsp70—2	[-640 ; +287]	Leptotènes à spermatides rondes	(Dix, 1996)
Sycp1	[-54, +5]	Leptotène/zygotène à pachytène	présente invention
CamII	[-294 ; +68]	Spermatocytes	(Ikeshima, 1994)
Hlt	[-1000 ; -1]	Spermatocytes primaires et spermatides	(Bartell, 1996)
β4-Gluc	[-543 ; +253]	Spermatocytes pachytènes et spermatides rondes	(Shaper, 1994)
Zfy1'	[-4300 ; -1]	Spermatocytes pachytènes et spermatides rondes	(Zambrowicz, 1994)
Tcp-10bt	[-973 ; -1]	Spermatocytes pachytènes à spermatides allongées	(Ewulonu, 1993)
Pgk-2	[-515 ; -1]	Spermatocytes pachytènes à spermatides allongées	(Robinson 1989)
Hst70	[-800 ; -1]	Spermatocytes pachytènes et cellules post-méiotiques	(Widlak, 1995)
Hox-a.4'	[-4000 ; +1000]	Spermatocytes pachytènes et cellules post-méiotiques	(Berhinger, 1993)
Proacrosin	[-2300 ; -1]	Spermatides rondes à allongées	Nayernia, 1994)
c-Kit	[-6232 ; +526] (16 <sup>ème</sup> intron)	Spermatides rondes à spermatozoïdes	(Albanesi, 1996)

ACE	[-698 ;-1]	(protéine tronquée)	(Langford, 1991)
Prm-1	[-2400 ;-1]	Spermatides allongées et spermatozoïdes	(Peschon, 1987)
		Spermatides allongées et spermatozoïdes	

La présente invention vise également les animaux transgéniques susceptibles d'être obtenus par les procédés décrits ci-dessus.

5

Un autre objet de la présente invention est une séquence nucléotidique permettant de promouvoir efficacement l'expression d'un gène d'intérêt pendant la première phase méiotique des spermatocytes d'un mammifère caractérisée en ce qu'elle comporte au moins une séquence ayant au moins 80 % d'identité avec la séquence SEQ ID n°1. De préférence ladite séquence nucléotidique comporte au moins la séquence SEQ ID n°1 ou SEQ ID n°2.

15 La région -54/+5 du promoteur Sycp1 (SEQ ID n°3) est la séquence minimale pour l'adressage de l'expression dans les spermatocytes. La région -260/+5 est toutefois requise pour une expression à un taux maximal.

20 Ainsi on définit la séquence nucléotidique du promoteur Sycp1 minimale pour promouvoir une expression efficace et adressée dans les spermatocytes comme comportant au moins une séquence ayant au moins 80 % d'identité avec la séquence SEQ ID n°1.

25 Les SEQ ID n°1 et SEQ ID n°2 sont les séquences -260/+5 chez la souris et -316/+5 chez le rat respectivement. De préférence, cette séquence nucléotidique est caractérisée en ce qu'elle comporte au moins la séquence SEQ ID n°1 ou SEQ ID n°2. Il va

de soi que toute séquence équivalente aux séquences SEQ ID n°1 et SEQ ID n°2, sont visées par la présente invention. On entend par séquence équivalente toute séquence d'un promoteur de Sycp1 de mammifère suffisante pour induire efficacement l'expression  
5 d'un gène d'intérêt spécifiquement dans les spermatocytes des mammifères, tel que par exemple les porcins, les ovins, les bovins, et les rongeurs.

Dans un aspect supplémentaire, l'invention concerne une  
10 séquence nucléotidique comprenant au moins une desdites séquence fusionnée à une séquence codante pour un gène d'intérêt. Le gène d'intérêt est de préférence un gène codant pour une recombinaise spécifique de site, notamment Cre. Elle porte aussi sur une molécule d'ADN comportant au moins cette  
15 séquence sous la forme d'un plasmide, d'un vecteur viral, d'un pseudo-vecteur, ou d'un ADN nu linéaire ou circulaire.

La présente invention vise également un animal transgénique possédant dans son génome ladite séquence nucléotidique  
20 permettant l'expression d'un gène d'intérêt spécifiquement dans les spermatocytes, de préférence une recombinaise spécifique de site, notamment Cre. La recombinaise demeure associée à la chromatine des spermatozoïdes.

Cet animal est utile pour les procédés précédemment mentionnés.

25 La présente invention vise également un procédé de recombinaison entre chromosomes paternels et maternels qui consiste à croiser un animal mâle portant dans son génome un ou plusieurs site(s) spécifique(s), avec un animal femelle portant  
30 dans son génome un ou plusieurs site(s) spécifique(s) caractérisé en ce que la recombinaise, exprimée lors de la première phase de la méiose, catalyse la recombinaison entre sites spécifiques.

Dans un autre aspect, l'invention porte sur un animal susceptible d'être obtenu par ce procédé et un animal multi transgénique obtenu en croisant les animaux susceptibles d'être obtenus par les procédés décrits supra. L'animal transgénique  
5 selon l'invention est un mammifère, notamment sélectionné parmi les ovins, les porcins, les bovins, et les rongeurs.

Un aspect avantageux de la présente invention concerne l'utilisation dudit animal transgénique pour la préparation de substances utiles en médecine, en cosmétique, et/ou en agro-  
10 alimentaire, notamment de substances actives, de préférence des peptides ou polypeptides, des anticorps, des antigènes, des hormones, ou des facteurs de croissance, et/ou pour la fabrication de suppléments alimentaires. Par exemple, on peut faire produire une protéine d'intérêt dans le lait de  
15 mammifères sous le contrôle d'un promoteur tissu spécifique ; par exemple WAP lapin ou WAP souris (demande de brevet Européen n° 92401635.5-2105).

On peut aussi utiliser ledit animal comme modèle expérimental pour l'identification de gènes, de promoteurs, de protéines,  
20 notamment de gènes impliqués dans les maladies génétiques, et/ou pour tester l'action de substances actives, pour la préparation d'organes ou de cellules présentant une meilleur immuno-compatibilité avec les humains que les organes ou cellules de type sauvage ou susceptibles d'avoir un faible taux  
25 de rejet par les défenses immunitaires des humains, et pour l'élevage.

La présente invention concerne également l'ensemble des éléments tels que décrits dans les revendications, lesdits  
30 éléments étant incorporés dans la description par référence.

Pour la suite de la description, on se référera aux légendes des figures présentées ci-dessous.

## LEGENDES DES FIGURES

Figure 1 : la recombinaison spécifique de sites.

5

A- Représentation schématique de la délétion de région génomique spécifique par recombinaison intramoléculaire entre des régions dites "floxées" situées entre deux sites LoxP.

10

B- Intégration ciblée d'une séquence étrangère catalysée par une recombinaison intermoléculaire entre deux ADN portant chacun un site LoxP.

Figure 2 : Recombinaison méiotique homologue entre chromosomes paternel et maternel en un site spécifique LoxP.

15

Figure 3 : activation du transgène loxP- $\beta$ geo sans promoteur après microinjection de la construction Pgk1-loxP.

20 A. Le plasmide pGK-lox comprend un fragment BamHI-HindIII, de PGK $\beta$ geobpA (Friedrich and Soriano, 1991) contenant le promoteur du gène Pgk1, inséré entre les sites BamHI (B) et HindIII (H) de pBS112 (Sauer and Henderson, 1990). L'ADN plasmidique a été clivé avec HindIII et PvuI (P) avant microinjection, ce qui a  
25 pour conséquence de supprimer le site loxP en 5'. La microinjection a été effectuée selon les techniques standards (Hogan, 1986) dans les œufs fertilisés provenant du croisement entre une femelle de type sauvage et un mâle double transgénique portant les transgènes Tcp-10bt-cre et loxP- $\beta$ geo.  
30

B, C et D. Les œufs microinjectés ont été maintenus en milieu de culture pendant 24 heures et ont été colorés avec X-Gal pour détecter l'activité  $\beta$ -galactosidase. B est le contrôle (pas de

microinjection). Aucune activité  $\beta$ -galactosidase endogène n'est détectée. C et D sont deux séries d'œufs dans lesquels on a microinjecté la construction décrite en A. L'activité  $\beta$ -galactosidase est détectée (coloration et flèches).

5

**Figure 4 : Insertion site spécifique de GFP au locus *Rxra*.**

A. Représentation schématique du génome de la souris mâle parente *Sycp1-Cre Rxra<sup>AAP2(LNL)</sup>* dans les cellules somatiques et  
10 dans les gamètes.

B. Carte du vecteur d'insertion de LoxP-GFP. Le plasmide a été construit par insertions successives à l'intérieur du plasmide pBS112 (pBR322 contenant un site LoxP, Sauer and Henderson,  
15 1990) des fragments suivants :

- BamHI-NcoI provenant de pGT1.8 IRES  $\beta$ geo (Mountford, 1994) avec une partie de l'intron En-2 du gène "engrailed" de la Drosophile, un accepteur d'épissage (Sa), et un Ires (Internal Ribosomal entry site).
- 20 - HindIII-EcoRI provenant de pEGFP (Clontech) contenant la région codante pour GFP.
- SacI-XhoI provenant de pSA $\beta$ geo avec le signal de polyadenylation (pA).

25 C. Schémas représentant la recombinaison effectuée par Cre conduisant à l'intégration dans *Rxra<sup>AAP2(L)</sup>* et le locus modifié résultant de la recombinaison spécifique de site.

D. Résultats de l'amplification PCR de l'ADN génomique de 13  
30 bébés obtenus à partir des œufs microinjectés en utilisant les amorces GFP1 et GFP2, et les amorces RXR1 et int2 (montre la

jonction RXR-int. La présence ou l'absence de Sycp1-Cre est vérifiée par southern blot.

Figure 5 : Structure et séquence de la région 5' du gène Sycp1 de la souris

A- Carte schématique de la région 5' de Sycp1

Les exons 1 et 2 sont numérotés, la présence du premier ATG et du site d'initiation de la transcription (+1) sont indiqués. Les limites des fragments utilisés pour la construction des différentes lignées transgéniques sont représentées. Les sites de restriction sont : B pour BamHI, P pour PstI, S pour SacII, et A pour ApaI.

B- Comparaison de la séquence de Sycp1 de la souris (M) et du rat (R).

Les sites de liaison putatifs pour les facteurs de transcription sont indiqués (encadrés dans des rectangles). La séquence transcrite (exon 1) est soulignée.

Figure 6 : Expression des diverses constructions Sycp1/luc dans une lignée cellulaire somatique

Chaque bar représente la moyenne de trois expériences, chacune réalisée trois fois. Les bars d'erreur indiquent l'erreur standard à la moyenne. Les valeurs statistiques ont été calculées en utilisant le test de Student pour cette figure et les autres. Tous les résultats sont relatifs au contrôle interne CMV/lacZ. Le vecteur contrôle (pXP1) contient le gène rapporteur de la luciférase sans promoteur. L'activité du plasmide SV40-luc a été fixé arbitrairement à 100.



Figure 7 : L'expression spécifique dans les testicules des gènes rapporteurs dans les lignées transgéniques [-722/+102]lacZ, [-260/+102]lacZ, [-260/+102]luc et [-54/+102]luc.

5

Chaque bar représente la moyenne de l'activité d'au moins cinq mâles transgéniques provenant de lots différents. Les bars d'erreur indiquent l'erreur standard à la moyenne. Cette activité est normalisée à la quantité de protéines et au bruit de fond des souris non transgéniques appartenant au même lot. Le faible niveau de l'activité lacZ est due à un niveau endogène élevé de type  $\beta$  galactosidase dans les cellules testiculaires. Pour chacun des chimères, deux lignées ont été étudiées en détail (1 et 2). Te représente les testicules, Li le foie, Sp la rate, Ki les reins, He le coeur et Lu les poumons.

Figure 8 : Expression du gène rapporteur luciférase dans les testicules de souris transgéniques [-54/+102] luc et [-260/+102]luc lors de leur développement.

Des extraits de foie ont été utilisés comme contrôle négatif. Chaque bar représente la moyenne d'au moins quatre mâles transgéniques provenant de lots différents. Les bars d'erreur indiquent l'erreur standard à la moyenne. P8 à P14 sur l'axe des abscisses représentent les stades de développement du huitième jour au quatorzième jour.

30

Figure 9 : Expression du gène rapporteur luc dans la souris transgénique [-260/+5] dans différents organes.

5 L'expression spécifique dans les testicules du gène rapporteur luciférase dans les souris transgéniques [-260/+5] luc est représentée. Trois lignées indépendantes ont été testées pour l'expression du gène rapporteur. Chaque bar représente l'activité moyenne pour au moins cinq mâles  
10 transgéniques. Les bars d'erreurs indiquent l'erreur standard à la moyenne parmi des expériences.  
La légende des divers organes testés est identique à la légende de la figure 7.

15

Figure 10 : Expression du gène rapporteur luciférase dans les testicules et le foie de souris appartenant à la lignée transgénique [-260/+5] au cours du développement.

20 Les barres rayée horizontalement représentent l'expression dans les testicules et les barres rayées en diagonale représentent l'expression dans le foie.

P8 jusqu'à P15 représentent les stades de développement du huitième jour au quinzième jour respectivement.

25 Les bars d'erreurs indiquent l'erreur standard à la moyenne parmi des expériences.

Figure 11 : Les transgènes Sycp1/lacZ ne sont pas exprimés pendant la méiose chez la femelle.

30

Des tests PCR ont été réalisés sur l'ARN provenant des testicules du foie de l'ovaire foetal E17 de souris transgéniques [-260/+102] lacZ et sur l'ARN de l'ovaire foetal

E16 de souris transgéniques [-1848/+102]lacZ. L'ARN a été prétraité avec la DnaseI et a été soumis ou pas à la digestion par la RnaseA (+ et -) avant la réverse transcription. Les transcripts Sycp1 sont détectés dans l'ARN des testicules adultes et l'ARN provenant des ovaires au stade embryonique du seizième jour (E16) et du dix-septième jour (E17), mais dans l'ARN du foie. L'ARNm de lacZ est seulement détecté dans les testicules adultes transgéniques.

Figure 12 : Excision des séquences floxées dans la descendance d'un mâle Sycp1-Cre/Rxra<sup>ΔAP2 (LNL)</sup>.

Les séquences Cre identifiées par amplification PCR avec une paire d'amorces Cre1 et Cre2 (Rxra allèle sauvage), Rxra<sup>ΔAP2 (L)</sup> (allèle délétée), et Rxra<sup>ΔAP2 (LNL)</sup> (allèle cible), avec RXR1 et RXR2 et tk-neo, avec tkneo1 et tkneo2 (Feil et al. 1996). La colonne 1 correspond à la souris progénitrice, et les colonnes 2 à 10 représentent des bébés appartenant à la même portée.

Figures 13 et 14 : délétion ciblée de gènes floxés multicopies dans des cellules germinales.

L'ADN a été préparé à partir de divers tissus provenant de mâles double transgénique progéniteur et extrait de la queue de leur descendance, digéré avec l'enzyme de restriction HindIII et en utilisant l'ADN plasmidique de pSAβgeo (colonne 1 à 7) ou par pPGKβgeobpA (colonne 8 à 13) comme sonde, qui révèle les séquences floxées et les séquences pBR322 du transgène Cre. Les colonnes 1 à 3 ont été chargées avec l'ADN d'un progéniteur double transgénique Sycp1-Cre/βgeo floxé (1 représente le foie, 2 les reins et 3 les testicules). Les

colonnes 4 à 6 correspondent à l'ADN extrait des queues de trois bébés obtenu avec une souris normale. La colonne 7 correspond à l'ADN d'une souris portant le transgène Sycp1-Cre (contrôle). La colonne 8 représente l'ADN et la colonne 9 l'ADN des testicules d'un progéniteur double transgénique Sycp1/Cre Pgk1 floxé. Les colonnes 10 à 13 correspondent à l'ADN des queues de quatre bébés obtenus. Les fragments de restriction sont indiqués par "c" qui est le fragment du transgène Cre ; "in" qui représente les fragments internes des transgènes prédits à partir de leur séquences nucléotidiques (les tailles respectives sont 3,9 et 2,4 kb pour  $\beta$ géo et 3 pour Pgk1) ; "j" correspond aux fragments de jonction avec les séquences cellulaires avoisinantes. Le transgène est représenté par une ligne simple, la séquence chromosomique par une double ligne, et les sites LoxP par un triangle.

#### Description détaillée.

Le procédé original de la présente invention permet donc de transférer une recombinaise dans les oocytes afin d'effectuer rapidement et avec une efficacité élevée toutes les opérations de recombinaison spécifique de site dans le génome des mammifères, en particulier l'insertion d'une séquence étrangère (knock in), le remplacement de séquences ou l'inactivation de gènes, et la recombinaison méiotique entre chromosomes parentaux (Voir figures 1 et 2). Cette méthode est fondée sur la surprenante démonstration que la recombinaise, exprimée pendant la méiose, est transmise en association avec la chromatine du spermatozoïde et est donc capable de catalyser une recombinaison de site prédéfini dans l'embryon avant la première division. Il est à noter que le transgène Cre est présent chez le père à l'état hémizygote. Ceci a pour conséquence que seulement 50% des descendants le reçoivent. En

revanche, tous reçoivent l'enzyme associée à la chromatine du gamète, et la recombinaison a lieu efficacement et uniquement dans les embryons au stade 1 cellule, ce qui assure la stabilité ultérieure des sites LoxP recombinés.

5

De plus, si le transgène est transmis, l'activité du promoteur s'éteint dans les cellules somatiques durant toute la vie de l'organisme, du développement embryonnaire jusqu'à sa sénescence. Ainsi, les modifications génétiques réalisées sont  
10 reproduites au cours du développement dans toutes les cellules de l'organisme, sans chimérisme décelable, lesdites modifications demeurant stables et immédiatement héréditaires. La méthode présentée est applicable aux organismes pour lesquels les techniques de transgénèse ont été jusqu'ici  
15 difficiles à développer (absence de lignées de cellules ES).

**Transfert de la recombinase Cre par la chromatine du spermatozoïde.**

20 Dans le cas du transgène Tcp-10-bt-Cre d'abord, puis dans celui du transgène Sycp1-Cre, on a montré que des molécules d'enzyme Cre synthétisées pendant la spermatogenèse restent associées à la chromatine compactée du spermatozoïde. Inactives dans ce contexte, elles peuvent néanmoins effectuer la  
25 recombinaison entre sites LoxP lors du retour à une structure nucléaire décompactée. Cette opération, qui peut être effectuée sur le sperme dans des conditions expérimentales, a lieu naturellement après la fécondation dans le pronucleus mâle du zygote.

30

L'activité de la recombinase a été testée dans les expériences suivantes :

Lors d'une première série d'expériences, des œufs fertilisés ont été obtenus à partir de femelles de type sauvage croisées avec des mâles hemizygotes pour le transgène *Tcp-10bt-cre* et pour une insertion multicopie de la région codante "floxée" du gène  $\beta$ geo sans promoteur. Une construction avec un site LoxP localisée en 3' du promoteur *Pgk1* a été microinjectée (figure 3A). selon les techniques standards (Hogan, 1986). Après 24 heures de culture, environ un embryon sur quatre révèle une coloration positive avec X-Gal (figure 3B, C, et D). L'expression du gène  $\beta$ geo est due à l'intégration efficace du promoteur microinjecté en amont de la région codante.

Une plus simple configuration génétique telle que la structure  $Rxra^{\Delta AP2(L)}$  a été utilisée afin de mettre en évidence l'intégration site spécifique de l'ADN microinjecté.

Cette deuxième série d'expériences a démontré la présence d'une activité Cre latente dans les spermatozoïdes des souris transgéniques *Sycp1-Cre*, dans lesquelles l'excision des séquences floxées a lieu pendant la gamétogenèse laissant seulement un seul site LoxP au moment de la fertilisation. De surcroît, ces expériences ont permis de savoir si la recombinaison est toujours active dans le pronucleus mâle et pourrait permettre l'intégration d'un transgène floxé dans un site LoxP prédéterminé. Des mâles qui possèdent le transgène *Sycp-1-Cre* et le locus  $Rxra^{\Delta AP2(LNL)}$  floxé ont été obtenus (Figure 4A). Dans le sperme de ces mâles, les séquences tkneo ont été abondamment excisées pour générer l'allèle recombiné  $Rxra^{\Delta AP2(L)}$ . Cet allèle est transmis à l'ensemble de la descendance qui ne conserve qu'un seul site LoxP restant. Les souris double transgéniques ont été croisées avec des femelles de type sauvage ; les embryons fertilisés ont été isolés ; et un ADN

recombinant comportant la séquence codante pour la protéine pour la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) en amont d'un accepteur d'épissage et d'un IRES (Internal Ribosomal Entry Sequence) (figure 4B) a été microinjecté. L'analyse PCR de la structure génomique, présentée à la figure 4D, montre que la séquence codante pour GFP a été insérée à l'intérieur du locus  $Rxra^{AF2(L)}$  (figure 4C) pour de nombreux bébés et qu'aucun animal conserve le locus LoxP intact. Les animaux du type  $Rxra^{+/-}$  sont sous-représentés.

Le locus  $Rxra$ -LoxP-GFP-LoxP résultant de la recombinaison est transmis et retrouvé dans les tissus somatiques de la descendance des femelles et des mâles Cre<sup>+</sup>. L'expression de GFP a été mise en évidence par microscopie par fluorescence dans la peau et les testicules de ces souris. Parmi les multiples applications offertes par le transfert efficace d'une recombinaison par la chromatine du sperme, des souris rapporteuses, chacune possédant un locus génomique portant une insertion avec un site LoxP et une région codante pour une protéine rapporteur (GFP, luciférase,  $\beta$ -galactosidase) peuvent être obtenues. L'introduction d'un transgène en une seule étape de microinjection peut servir à identifier un promoteur, ou analyser un promoteur mutant dans un contexte génomique connu et dans tous les organes de la souris. De même, il est possible d'insérer diverses séquences rapporteurs, des régions codantes mutées, des gènes codants pour des toxines, et n'importe quelle région codante d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur donné.

La méthode pour l'insertion ciblée d'une séquence portant un site LoxP microinjectée dans l'oeuf fécondé produit du croisement d'un mâle double transgénique Sycp1-Cre / LoxP est présentée à la figure 4 et est résumée ci-après :

- 1) La constitution par croisement d'une souris double transgénique portant le transgène Sycp1-Cre et une structure dans laquelle deux sites LoxP entourent une séquence étrangère (gène tkneo) ;
- 2) les deux transgènes sont maintenus intacts dans les tissus somatiques de la souris; la synthèse de Cre dans la lignée germinale résulte en l'excision de la séquence floxée (tkneo) dans le sperme des mâles ;
- 3) un mâle est croisé avec une souris de type sauvage pour le locus Rxra et Cre; l'enzyme Cre reste associé au site LoxP de l'allèle Rxra muté dans la chromatine (50% des embryons); indépendamment 50% des embryons reçoivent le transgène Cre ;
- 4) la recombinaise est libérée après décondensation de la chromatine ;
- 5) un ADN recombinant LoxP-SA-IRES-GFP-polyA est microinjecté dans le pronucleus mâle 15 heures après fécondation par les techniques classiques (Hogan et al 1986) ;
- 6) tous les embryons, Cre<sup>+</sup> ou Cre<sup>-</sup>, ayant reçu le gène comportant un site LoxP, y ont inséré la région codant pour la protéine GFP grâce à l'action de la recombinaise;
- 7) expression : le site LoxP avait été inséré dans un intron du gène Rxra. La présence d'un accepteur d'épissage (SA) permet l'inclusion de la séquence IRES-



GFP dans un messenger fonctionnel, celle d'un site IRES (Internal Ribosome Entry Site) permet la traduction de l'ARN dont l'extrémité 3' est définie par le signal de poly-adénylation ("polyA") ajouté en aval de la région codante. La fluorescence verte caractéristique de l'expression du nouveau rapporteur est mise en évidence dans les organes connus pour exprimer le récepteur Rxra.

Dans les expériences menées lors de l'accomplissement de la présente invention, l'efficacité de recombinaison a été comprise entre 50 et 80% (recombinants rapportés au nombre de souriceaux nés après microinjection).

Il va de soi que le procédé de la présente invention, notamment illustré ci-dessus, n'est aucunement limité à une région particulière pour l'insertion du transgène, à un transgène particulier, à un promoteur particulier contrôlant l'expression d'une recombinaise spécifique de site, ou encore à une recombinaise spécifique de site particulière.

L'étendue des applications rendues possibles grâce aux transferts d'une recombinaise par la chromatine des spermatozoïdes est notamment illustrée par les différents cas de figures suivants :

#### Identification d'un promoteur spécifique d'un tissu.

Une "souris rapporteuse" est réalisée qui porte un transgène comportant les séquences LoxP-IRES-GFP-polyA intégrées en un site chromosomique, soit par transgénèse et recombinaison illégitime, soit par recombinaison homologue.

L'insertion en amont de fragments génomiques clonés dans un vecteur comportant également un site LoxP permet, dès la première génération de souris, d'identifier les animaux, donc le fragment qui expriment la GFP dans le tissu d'intérêt.

5 Plusieurs "souris rapporteuses" peuvent être utilisées en parallèle, avec des gènes rapporteurs différents (notamment  $\beta$  galactosidase ou luciférase), à différentes localisations chromosomiques. On peut également insérer un gène d'intérêt codant pour une protéine d'intérêt exprimé par exemple dans le

10 lait de mammifère.

#### **Analyse du patron d'expression d'un promoteur.**

L'insertion d'un rapporteur en aval d'un promoteur (GFP en

15 aval de Rxra) permet d'établir avec précision le patron d'expression du promoteur intact dans sa localisation génomique naturelle.

#### **Expression de gènes hétérologues ("knock in").**

20 Selon le patron d'expression après l'insertion d'un gène rapporteur, on pourra réaliser l'expression de tout gène biologiquement actif sous le contrôle transcriptionnel du promoteur d'intérêt. Par exemple, on peut insérer un gène

25 codant pour une toxine, notamment la toxine diphtérique, sous le contrôle d'un promoteur tissu spécifique, et provoquer ainsi la destruction de cellules données éventuellement à un stade donné du développement.

#### **30 Analyse de mutants.**

L'insertion de cassettes comportant différents mutants d'une même séquence permet de comparer leurs propriétés dans un

contexte chromosomique constant, et dans des conditions physiologiques constantes ou variables.

5

Le promoteur Scyp1 peut-être utilisé dans le procédé selon l'invention.

Le gène Sycp1 est exprimé uniquement pendant la prophase  
10 de la première division méiotique dans les cellules germinales mâles et femelles (Meuwissen et al, 1992 ; Heyting et al. 1989 ; Offenberger et al. 1991 ; Dietrich et al. 1992 ; Moens et al. 1992 ; Dobson et al. 1994 et Dietrich et al. 1983). La séquence nucléotidique de la région 5' du gène Sycp1 de la souris a été  
15 décrite par Sage et al. 1997 (figure 5A). La région en amont du gène ne contient pas de TATA box, mais le site de transcription comprend l'élément initiateur CCA'GTCC (Smale et al. 1989). Le criblage d'une librairie génomique avec un fragment Pst1 de l'ADNc de rat (692 bp) qui couvre les 585 bp de l'extrémité 5'  
20 de la région codante de Sycp1 et un morceau de la séquence leader non traduite (Meuwissen et al. 1992 ; Sage et al. 1995), a conduit à l'identification de cinq clones génomiques, dont l'un d'entre eux comprend la région 5' en amont du site d'initiation de la transcription.

25

Le fragment BamH1 s'étendant le plus loin du côté 5', qui hybride avec la sonde ADNc 692 bp, a été sous-cloné et sa séquence nucléotidique a été établie. La séquence nucléotidique dans la région analysée, s'étendant des positions -324 à +268  
30 montre une identité globale de 80 % entre les deux espèces (figure 5b).

Le haut degré de conservation entre les deux espèces est une indication claire que cette région contient d'importants éléments régulateurs.

5 L'analyse transgénique et plusieurs séries de délétions à l'intérieur du promoteur Sycp1 ont permis de définir deux régions fonctionnelles différentes. Un enhancer fort est présent entre les position -260 et -54. Un élément proximal de 59 bp de long (-54 à +5), est suffisant pour diriger  
10 l'expression de gènes rapporteurs hétérologues (lacZ et luc) dans les cellules germinales mâles appropriées (figure 5).

Puisque l'enhancer présent dans le promoteur Sycp1 est actif dans des lignées cellulaires de diverses origines, il est  
15 clair que ce promoteur dépend de l'action de facteurs de transcription ubiquitaires. Le fragment entre les positions -54 et +5 est suffisant pour diriger l'expression de la luciférase dans les spermatocytes primaires. Les comparaisons de séquences entre les quatre gènes méiotiques précoces de la souris (Sycp1, Hsp70-2, Pdha-2, et Xmr), n'ont révélé aucune conservation d'un  
20 site de liaison pour des facteurs de transcription. Il existe cependant, un haut degré de similarité (80%) entre les séquences du promoteur Sycp1 chez la souris et le rat. Par exemple, une E-box et un site potentiel pour des facteurs de  
25 transcription du type Myb sont conservés.

Dans les ovaires, où la méiose est initiée lors des phases précoces de développement, aucune expression des gènes rapporteurs n'est observée dans les oocytes. Ainsi le promoteur  
30 Sycp1 est très avantageux comme outil pour diriger l'expression de la recombinaise Cre, car son profil d'activité permet la stabilité génétique des organismes et de leurs descendance.

La recombinaison induite par Cre au site LoxP a été programmée pour avoir lieu pendant la méiose dans les cellules germinales mâles. Le gène Cre, a été exprimé sous le contrôle transcriptionnel d'une région du promoteur du gène Sycp1, qui  
5 est active au stade leptotène-zygotène de la méiose chez les mâles. Malgré le fait que le gène est exprimé chez les gonades mâles et femelles, la région sélectionnée du promoteur qui a été utilisée dans la construction Sycp1-Cre a conduit à l'expression du transgène exclusivement dans les testicules.

10

En conséquence, les sites "floxés" n'ont jamais été altérés dans la descendance des femelles. Les séquences "floxées" ont été maintenues de manière stable dans les tissus somatiques (sauf dans les testicules. Aucune expression n'a été  
15 détectée lors des stades embryonnaires postérieurs à l'implantation et dans les tissus adultes même en utilisant la technique très sensible RT-PCR (Meuwissen et al. 1992).

La recombinaison induite par Cre dans les testicules représente un procédé avantageux comparé à celui décrit lors de  
20 précédentes études sur l'activité de la recombinase dans d'autres tissus de la souris (Akagi et al. 1997 ; Gu et al. 1994 ; Wagner et al. 1997). En effet, lorsque l'on teste la descendance obtenue par le procédé de la présente invention, on  
25 s'aperçoit que tous les allèles "floxés" transmis par les mâles ont subi une recombinaison. Une telle fréquence de recombinaison est particulièrement adaptée pour le système de recombinaison Cre/lox.

30 La recombinase Cre peut être exprimée au stade précoce de la spermatogénèse.

On a isolé le promoteur du gène Sycp1 (Synaptonemal Complex Protein 1), actif exclusivement pendant les premiers stades de la méiose et obtenu l'expression ciblée lors des stades zygotène à pachytène de gènes rapporteurs dans des souris transgéniques. On a utilisé ce promoteur, ainsi que celui d'un promoteur méiotique plus tardif (Tcp-10-bt, Ewunolu et al. 1993) pour faire exprimer l'enzyme CRE au cours de la spermatogenèse chez des souris transgéniques. Dans le cas de Sycp1, on constate chez les mâles qui portent également un transgène "floxé", l'excision de ces séquences pendant la spermatogenèse. Cette excision n'a pas lieu chez les mâles porteurs du transgène Tcp10-bt-Cre. La recombinaison est bien synthétisée, mais à une période où débutent la restructuration et le compactage de la chromatine, ce qui est très probablement la cause de l'absence de recombinaison avant la formation du spermatozoïde.

#### Recombinaison des sites LoxP pendant la méiose.

On a montré que l'expression à partir du transgène Sycp1-Cre pendant le stade pachytène de la première division de méiose permet la recombinaison entre des sites LoxP à des positions non identiques sur les chromosomes d'origine paternelle et maternelle, selon le schéma de la figure 2. Les marqueurs moléculaires disponibles sur les chromosomes paternels et maternels permettent de montrer un échange entre chromatides appariées aux sites LoxP. La fréquence de l'événement de recombinaison dans la descendance des mâles Sycp1-Cre portant les deux chromosomes "loxés" est de l'ordre de 30%. A partir de cet exemple, toute construction de chromosomes recombinés est possible à partir de sites LoxP introduits par les méthodes classiques de recombinaison homologue dans la cellule ES, de sites insérés par transgenèse

et recombinaison illégitime, ou de sites introduits par les méthodes d'addition ciblée.

#### Activité du promoteur Sycp1 dans diverses lignées cellulaires.

5

On a construit une série d'ADN recombinants avec différentes parties de la séquence 5' en amont de la région transcrite de Sycp1 (figure 5a) liée soit au gène codant pour la  $\beta$ -galactosidase ou pour la luciférase. On a d'abord effectué  
10 une recherche des lignées cellulaires qui exprime le gène Sycp1 afin d'obtenir une base expérimentale pour l'identification des éléments génétiques importants pour l'expression pendant la méiose.

15

On a ensuite utilisé une série de lignées cellulaires d'origine non germinale pour mesurer l'expression des gènes rapporteurs après transfection des ADN recombinants, dans l'espoir qu'au moins une faible activité pourrait révéler la présence du promoteur. De manière inattendue, toutes ces  
20 lignées cellulaires ont montré à un haut niveau d'activité luciférase après transfection des divers ADN recombinants (figure 6). Ces résultats démontrent que même le plus petit fragment Sycp1 s'étendant seulement jusqu'au nucléotide -54 permet l'expression de la luciférase (à un niveau faible mais  
25 détectable).

30

Une activité distincte du promoteur, bien que non apparentée à une activité spécifique de la méiose, est donc contrôlée par les séquences de la région 5' proche du gène Sycp1. On peut donc conclure que soit des éléments silencier non compris dans le fragment le plus long testé (1950 bp) empêche l'expression de Sycp1 dans les cellules somatiques in vivo,

soit la spécificité germinale dépend d'un système de signal perdu dans les cellules somatiques en culture.

#### Expression spécifique dans les testicules des souris 5 transgéniques

Quatre fragments différents du promoteur de Sycp1 ont été testés pour leur capacité à diriger l'expression de gène reporteur dans des souris transgéniques ([-1848/+102], (-  
10 722/+102], [-260/+102] et [-54/+102]).

Les trois plus longs fragments du promoteur ont été testés sur la base de l'expression du gène lacZ. Sachant que le faible niveau d'expression par le fragment [-54/+102] et que le bruit de fond de l'activité  $\beta$ -galactosidase dans les extraits de  
15 testicules est relativement élevé (Shaper et al. 1994) la luciférase a été utilisée dans ce cas comme rapporteur. Par comparaison, l'expression de la luciférase a été testée en parallèle pour le fragment [260/+102]. Les résultats, présentés au tableau 2 ci-dessous, démontrent que, dans chaque cas, au  
20 moins deux familles expriment le transgène exclusivement dans les testicules. Ceci a été constaté même pour la souris qui porte la plus courte séquence Sycp1 [-54/+102].



TABLEAU 2

LIGNES TRANSGENIQUES COMPORTANT DES FRAGMENTS DU PROMOTEUR Sycp1.

Nom transgénique et gène rapporteur	Longueur du fragment	Nombre de lignées transgéniques indépendantes	Nombre de souris adultes testées	Profil de l'expression
[-1848/+102]lacZ	1950	2	>10	Spécifique- spermatocyte "
[-722/+102]lacZ	824	5	>50	"
[-260/+102]lacZ	362	2 (+3 *)	>10	"
[-260/+102]luc	362	2 (+1 *)	>20	"
[-54/+102]luc	156	2 (+1 **)	>20	"
[-260/+5]luc	265	3 (+3 *)	>10	"

\* lignées sans expression

\*\* lignées avec expression

Cependant, le niveau d'expression est plus faible dans les familles [-54/+102], ce qui implique que la séquence s'étendant jusqu'au nucléotide -54 exerce un effet enhancer in vivo, comme  
5 cela est le cas dans les lignées cellulaires somatiques transfectées.

Cet effet quantitatif a été évalué en comparant les activités enzymatiques dans les testicules de souris portant le  
10 reporteur luciférase contrôlé soit par le promoteur [-54/+102], soit par le promoteur [-260/+102] de Sycp1. Ce dernier a montré de manière constante un niveau d'activité 10 à 100 fois supérieures (figure 7).

15 **Expression lors de la méiose dans les testicules adultes.**

L'expression spécifique de la  $\beta$ -galactosidase dans les testicules a été confirmée par coloration X-gal de plusieurs organes. Afin d'identifier les types cellulaires exprimant les  
20 transgènes, on a ensuite analysé l'activité  $\beta$ -galactosidase in situ dans des sections de testicules.

Les cellules X-gal positives des animaux [-260/+102]lacZ correspondent à la seconde couche des cellules germinales  
25 situées à la périphérie des tubules. Une sur-coloration avec l'hématoxyline a confirmé que les cellules lacZ positives font partie des spermatocytes au stade III-IV à pachytène du cycle de l'épithélium séminifère (Clermont et al. 1972). Au stade zygotène et pachytène précoce, une plus faible expression  $\beta$ -  
30 galactosidase a pu être détectée dans certaines sections. Aucune coloration des cellules n'a été observée dans le compartiment postméiotique des tubules ni pour les spermatocytes zygotènes précoces et diplotènes.

L'expression endogène du gène Sycp1 est absente ou très faible pendant ces stades (figure 8). Ces résultats indiquent que les séquences impliquées dans l'induction ou la suppression de l'expression de Sycp1 sont localisées parmi les fragments du promoteur analysés.

Afin de déterminer si la partie du promoteur de Sycp1 (+1 à +102) présent dans ces fragments joue un rôle dans l'établissement du profil d'expression des gènes rapporteurs, deux familles transgéniques supplémentaires ont été générées par microinjection d'ADN recombinant délétés de ces fragments, mais conservant l'initiateur de la transcription de Sycp1 avec les séquences en amont jusqu'au nucléotide -260. Les expériences enzymatiques démontrent que la spécificité et le niveau d'expression du promoteur [-260/+5] sont comparables à ceux du promoteur [-260/+102] dans les cellules transfectées (figure 6) et dans les animaux transgéniques (figures 9 et 10, comparées à la figure 5).

#### Régulation lors du développement chez les souris prépubères.

L'expression des gènes reporteur chez les animaux immatures a été mesurée afin de démontrer que l'expression d'un transgène est identique à celle du gène Sycp1 endogène. La première vague de méiose dans les testicules juvéniles est synchrone avec l'apparence des premières cellules méiotiques, les spermatocytes leptotènes, environ 10 jours après la naissance.

Les premières cellules pachytènes sont apparues au 14<sup>ème</sup> jour et les premières cellules haploïdes après trois semaine (Bellvé et al. 1977). Nous avons analysé les familles

transgéniques [-260/+102]lacZ, [-260/+102]luc, [-260/+5]luc, et [-54/+102]luc.

L'analyse in situ (figure 8) a permis de détecter  
5 l'expression de la  $\beta$ -galactosidase dans les spermatocytes  
primaires pour la souris [-260/+102]lacZ au 13<sup>ème</sup> et 15<sup>ème</sup> jour  
après la naissance, mais pas au 8<sup>ème</sup> jour. Au 10<sup>ème</sup> jour,  
l'expression a été détectée seulement sur certaines souris, et  
dans les cas où le résultat est positif, elle n'a été observée  
10 que dans certains tubules. Ces résultats ont été confirmés par  
les mesures réalisées sur les souris transgéniques [-  
260/+102]luc. Aucune expression de la luciférase n'a été  
détectée avant le 10<sup>ème</sup> jour après la naissance.

15 Dans les souris [-54/+102]luc et [-260/+5]luc, le profil  
temporel de l'activité de la luciférase est le même, est  
identique que celui du gène endogène (Sage et al. 1997).

L'ensemble de ces résultats a permis de conclure qu'un  
20 fragment de 59 bp (-54/+5) du promoteur Sycp1, couvre une  
séquence initiatrice de 7 bp et un fragment immédiatement en  
amont de 52 bp qui est suffisant pour diriger l'expression d'un  
transgène au début de la première division méiotique dans les  
gonades mâles.

25 Aucun des transgènes qui sont exprimés dans les testicules sont  
transcrits dans l'ovaire.

Chez les mammifères, la gamétogénèse femelle a lieu  
30 pendant le développement embryonnaire et est arrêtée avant la  
naissance au stade dictyotène. Lors de la prophase de la  
première division méiotique, le complexe synaptonémal est  
morphologiquement identique que celui des cellules

spermatogéniques (Dietrich et al. 1983 , Scherthan et al. 1996) ; et est plus visible au stade pachytène (Dietrich et al. 1992). On observe ce phénomène dans l'ovaire fœtal pendant les 15<sup>ème</sup> et 17<sup>ème</sup> jours embryonnaires (E15 et E17). Les expériences  
5 d'immunolocalisation réalisées sur des cryosections avec un anticorps dirigé contre la protéine SCP1 du rat (Meuwissen et al. 1992 ; Dietrich et al. 1992) ont permis de détecter la protéine SCP1 (codée par Sycp1) dans les ovaires de la souris E16 et E17. On a ensuite analysé l'expression dans les ovaires  
10 des gènes rapporteurs exprimés par diverses familles transgéniques pendant la méiose mâle. Ni la détection in situ de la  $\beta$ -galactosidase, ni le test à la luciférase plus sensible n'ont permis de détecter une expression du transgène.

Des expériences RT-PCR réalisées avec l'ARN des ovaires  
15 E16 de [-1848/+102]lacZ et des ovaires E17 de [261/+102]lacZ souris transgéniques n'ont pas permis de détecter les transcrits fusionnés entre le premier exon de Sycp1 et la séquence lacZ, alors que l'expression du gène endogène a été détectée dans les mêmes échantillons (figure 11).

20

Une possible explication de l'absence de l'expression est l'utilisation d'un promoteur Sycp1 alternatif dans la lignée germinale femelle, comme cela était montré pour le cas du gène de l'ADN méthyltransférase (Mertineit et al. 1998).

25

Pour confirmer cette hypothèse, on a utilisé la technique 5' RACE pour déterminer le site d'initiation de la transcription de Sycp1 dans les cellules méiotiques provenant des ovaires E16. Douze clones contenant les plus longs  
30 fragments d'ADNc parmi 48 clones analysés, ont été séquencés. Ces séquences indiquent clairement que la transcription du site d'initiation de la transcription chez les cellules germinales de la femelle est identique à celle précédemment définie chez

les cellules germinales mâles. Il apparaît ainsi que les signaux qui assurent l'expression temporelle et spatiale du gène Sycp1 lors de la méiose mâle ne sont pas suffisants pour son expression chez la femelle.

5

**Maintenance somatique des séquences "floxées" dans les tissus de mâles transgéniques Sycp1-Cre/LoxP.**

On a établi quatre familles transgéniques indépendantes portant le transgène Sycp1-Cre. Aucune différence au niveau des propriétés de ces familles ayant été notée, on a choisi aléatoirement une famille pour la suite des études. Les résultats obtenus ont démontré que le transgène, maintenu de manière stable, n'a été transcrit que dans les testicules.

15

Des lignées doubles transgéniques, qui maintiennent Sycp1-Cre avec un transgène "floxé" ont été obtenues en croisant une souris Sycp1-Cre avec une souris dont son génome porte un transgène "floxé". Les techniques d'intégration d'un transgène "floxé" dans le génome d'un mammifère sont notamment décrites dans Kuhn and Schwenk, 1997, Galli-Taliadoros et al. 1995, et Feil et al. 1996. En l'espèce, deux sites cibles ont été créés par microinjection à l'intérieur des œufs fertilisés d'un ADN cloné : une répétition en tandem d'une séquence  $\beta$ geo flanquée de site LoxP (Friedrich et Soriano, 1991) et une insertion en tandem à faible nombre de copies (moins de deux copies) d'un promoteur actif (LoxP-Pgk1). Un troisième site cible correspond à l'allèle  $Rxra^{\Delta P2(LNL)}$  (Feil et al. 1996), dans lequel une cassette LoxP-tk-neo-LoxP a été insérée par recombinaison homologue dans le 8<sup>ème</sup> intron de  $Rxra$ . Chez les mâles portant des transgènes LoxP- $\beta$ geo et LoxP-Pgk1, l'hybridation "Southern blot" indique une stabilité totale de ces loci dans les organes somatiques.

Une analyse plus détaillée réalisée sur des animaux Sycp1-Rxra<sup>ΔAF2 (LNL)</sup> a montré que une partie des mâles (2 sur 8 testés) maintiennent dans leur ADN somatique à la fois des séquences "floxées" recombinaison et intactes. Cette observation est en accord avec les résultats des études sur le promoteur Sycp1 mentionnées ci-dessus. Ainsi, la structure des transgènes "floxés" établie à la naissance demeure stable dans tous les organes somatiques, même en ce qui concerne les mâles sénescents. Les animaux chimères ont été écartés et de plus amples études ont été conduites avec les mâles dans lesquels le test PCR sensible n'a pas permis de détecter une recombinaison somatique. Les séquences "floxées" modifiées ont été dans chaque cas seulement détectées dans les testicules et dans l'ADN du sperme.

**Délétion du loci "floxé" lors de la transmission par les mâles Sycp1-Cre/LoxP.**

Dans la descendance des croisements entre des animaux doubles transgéniques avec des partenaires non transgéniques, l'excision des séquences intervenantes ont toujours été observées lorsque le locus "floxé" a été transmis par les mâles Sycp1-Cre/LoxP, alors que les mêmes loci ont été totalement stables lorsqu'ils ont été transmis maternellement. Ces résultats sont montrés à la figure 12 pour la descendance d'une femelle de type sauvage avec un mâle hétérozygote pour l'allèle "floxé" Rxra<sup>ΔAF2 (LNL)</sup> et hémizyote pour le transgène Sycp1-Cre. L'amplification PCR de l'ADN extrait de la queue du père (colonne 1) n'a pas détecté la présence de séquences "floxées" (fragment appelé "tkneo"). Aucun des neuf bébés (colonnes 2 à 10) ne possède ce fragment. Ce résultat correspond en fait à deux situations distinctes :

- Deux bébés (colonnes 4 et 10) ont reçu l'allèle sauvage Rxra du père (identifié par l'amplification caractéristique du produit ("RXRα")).
- 5 - Les autres bébés ont hérité de l'allèle Rxra<sup>AAP2(LNL)</sup> pour lesquels les séquences tk-neo ont été excisées.

L'amplification avec les deux amorces RXR1 et RXR2 ont généré un plus large fragment caractéristique du locus recombiné ("RXRα<sup>AAP2(L)</sup>"). L'excision a été constatée  
 10 indépendamment de la présence (colonnes 2, 6, 8, 9) ou l'absence (colonnes 3, 4, 5, 7, 10) du transgène Sycp1-Cre. Des résultats similaires ont été obtenus pour le transgène multimérique β-geo-LoxP et le transgène Pgk1-LoxP (figure 13).  
 15 L'excision dans ce cas est mise en évidence par la disparition des bandes qui correspondent sur les "Southern blots" aux fragments internes prédits à partir de la séquence du transgène ("in"), alors que les fragments des jonctions avec les séquences endogènes ("j") ont été, dans tous les cas,  
 20 maintenues. Chez les parents mâles, les séquences "floxées" n'ont pas été modifiées (colonnes 1, 2, 8, figure 14), à l'exception de l'ADN des testicules (colonnes 3 et 9).

#### Exemple 1 : Culture cellulaire et expériences de transfection.

25 La lignée cellulaire BALB/3T3 (clone A31 American Type Culture Collection n°CCL-163) et a été transfectées avec 2 µg du promoteur chimère avec 0,1 µg d'une construction CMV-lacZ Contrôle, en utilisant la méthode de la co-précipitation au  
 30 phosphate de calcium (Sambrook et al. 1989). 2 x 10<sup>4</sup> cellules ont été inoculées par boîte de 35 mm. Les tests enzymatiques ont été réalisés deux jours après la transfection.



**Exemple 2 : Microinjection et analyse des souris transgéniques.**

Les souris transgéniques ont été générées par  
5 microinjection d'un ADN plasmidique à l'intérieur des œufs  
fertilisés selon les techniques couramment utilisées par  
l'homme du métier (Hogan et al. 1986). La vérification des  
animaux transgéniques a été réalisée par Southern et/ou Analyse  
dot blot de l'extrémité de l'ADN (Sambrook et al. 1989). Toutes  
10 les familles transgéniques ont été générées et maintenues dans  
un arrière-plan génétique C57BL/6xDBA/2 F1.

**Exemple 3 : Isolation des clones génomiques de rats**

15 Les clones génomiques de rats ont été isolés par criblage  
d'une banque génomique (Sambrook et al. 1989) dans un vecteur  
lambda DASH (stratagène) avec une amorce d'ADNc de rat  
(Meuwissen et al. 1992).

**20 Exemple 4 : Analyse de la séquence**

Le séquençage de l'ADN a été réalisé en utilisant le kit  
Sequenase II (Amersham). Le programme informatique FASTA du  
Genetic Computer Group a été utilisé pour les comparaisons de  
25 séquences dans des banques de données. Les numéros d'accès  
dans les bases de données Genbank et EMBL pour les séquences du  
promoteur chez le rat et la souris sont respectivement AF020295  
et AF020296.

**30 Exemple 5 : Construction plasmidique**

Tous les fragments du promoteur Sycp1 proviennent d'un  
clone génomique contenant 12Kb de séquences en amont du site  
d'initiation de la transcription de Sycp1 (figure 5) (Sage et

al. 1997). A leur extrémité 3', tous les fragments testés du promoteur (à l'exception d'un fragment, voir infra) s'étendent au site SacII qui se situe dans le premier exon à la position +102 (Sage et al. 1995). La coupure du clone génomique avec BamHI et SacII a conduit à un fragment de 2Kb qui a ensuite été traité avec le fragment Klenow de l'ADN polymérase (Biolabs) et inséré au site EcoRV dans le vecteur pBluscript KS (-) (stratagène). Un fragment EcoRI-XhoI de 1950 pb a ensuite été subcloné dans le plasmide p $\alpha$ ss $\beta$  (clontech, numéro d'accension U02433) portant le gène rapporteur lacZ ([-1848/+102] lacZ plasmide). Afin d'obtenir des chimères comprenant de plus courtes séquences génomiques, des amplifications PCR ont été réalisées en utilisant des oligonucléotides internes de 18 bp amorce 5' en conjonction avec l'amorce T3 sur le même fragment BamHI-SacII subcloné dans pBluescript. Les fragments PCR ont été clonés dans le vecteur pBluescript KS(-), vérifié par séquençage et transféré dans les sites EcoRI-XhoI du plasmide p $\alpha$ ss $\beta$ . Les mêmes fragments du promoteur ont ensuite été transférés devant le gène rapporteur luciférase dans le plasmide pXP1 (Lee et al. 1994) (ces plasmides portent les mêmes noms que précédemment avec "luc" à la place de "lacZ". Un plasmide supplémentaire a été construit avec les séquences 5' en amont entre les positions -260 et +5. Un fragment PCR a été amplifié avec la même amorce 5' utilisée pour le chimère [-260/+102] lacZ, l'autre amorce couvre le site d'initiation de transcription de Sycp1 (position +5/-15). Ce fragment de 275 bp a été subcloné dans pXP1 pour former le plasmide [-260/+5]luc.

#### Exemple 6 : Isolation de l'ARN et analyse

30

L'ARN total a été préparé selon la méthode isothiocyanate (Chomezynski et al. 1987). Des échantillons d'ARN du contrôle et de souris Myb<sup>-/-</sup>A ont été utilisés (Toscani et al. 1997). Des

ovaires fœtaux provenant d'une femelle enceinte ont été rassemblés, et afin de s'assurer que les préparations ARN sont comparables, la même quantité de testicule et de foie a été utilisée. L'ARN totale a été traitée avec DNaseI (Boehringer), puis extrait au phénol et précipité à l'éthanol. 2 µg d'ARN a été reverse transcrit et amplifié en utilisant le kit Titan de Boringer. En ce qui concerne les réactions de contrôle, l'ARN a été prétraité avec la RnaseA. Les séquences des amorces utilisées pour détecter les transcrits Sycp1 correspondent aux positions 115-135 et 495-475 dans l'ADNc (Sage et al. 1995), conduisant à un produit de 380 pb de long. Les oligonucléotides utilisés pour détecter les transcripts de fusion entre eux Sycp1 et lacZ se trouve à la position 50-68 dans l'ADNc de Sycp1 et à position 444-425 dans le rapporteur lacZ du plasmide pnassβ. Les conditions des cycles PCR ont été 30 secondes à 94° C, une minute à 55° C et 30 secondes à 72° C pendant 32 cycles. Les produits de cette réaction ont été hybridés avec une sonde interne (position 245-265 dans l'ADNc Sycp1 et 358-378 dans le plasmide pnassβ. Les fragments d'ADNc Sycp1-lacZ ont été subclonés dans pBluescript et séquencés afin de confirmer le correct épissage de l'intron SV40.

La détermination de l'extrémité 5' du gène Sycp1 dans les oocytes a été réalisée en utilisant le kit 5' RACE de Boehringer en suivant la procédure précédemment décrite dans Sage et al. 1997.

#### Exemple 7 : Test de l'activité des gènes rapporteurs

L'activité β galactosidase a été testée sur des extraits de tissus en utilisant le substrat Galacton tel que décrit dans Shaper et al. 1994. La détermination in situ a été effectuée en utilisant une procédure alternative à la cryosection, ce qui a permis une meilleure conservation de la structure de

l'épithélium seminifère. L'albuginea a été enlevée et le tissu a été soigneusement étendu avec l'aide de forceps afin de faciliter la pénétration de X-gal. Une fixation dans 2% de paraformaldéhyde pendant une heure à 4°C précède une incubation pendant 16 heures à température ambiante dans 0,2% de X-gal. Après la coloration, les testicules ont été post-fixés pendant 24 heures dans 10% de paraformaldéhyde et l'inclusion a été réalisée dans la « Leica Historesin » en suivant les instructions du fabricant (Leica Instruments). Des sections de 5 µm d'épaisseur ont été sur-colorées avec l'hématoxyline Harris. L'activité luciférase a été mesurée à l'aide du "Luciferase Assay System" (Promega) selon les instructions du fabricant.

**Exemple 8 : Immunolocalisation de la protéine SCP1 de la souris**

La cryosection de 8 µm d'épaisseur de testicules embryonnaires âgées de 15 ou 16 jours (E15 ou E16) ont été incubés avec des anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine du rat comme précédemment décrit dans Meuwissen et al.

**Exemples 9 : Constructions des plasmides et production des souris transgéniques.**

Le plasmide Sycp1-Cre a été construit en deux étapes. Un fragment du promoteur [-722/+102] du gène Sycp1 s'étendant de -722 à +102 relativement au site d'initiation de la transcription (Sage et al. 1997, voir supra) a été transféré dans le plasmide pBluescript KS (Stratagène) entre les sites EcoRI et XhoI. La séquence codante pour la recombinaise Cre (Numéro d'accèsion Genbank X03453) et un signal de polyadénylation a été ensuite inséré dans le premier plasmide digéré avec les enzymes de restriction SalI et KpnI. Dans le

plasmide p $\beta$ geo-LoxP (Friedrich et Soriano 1991), le gène de fusion  $\beta$ geo a été intégré entre deux sites sites LoxP. Ce plasmide a été construit en insérant un fragment HindIII-BamHI correspondant à la séquence codante provenant du plasmide p $\beta$ geo à l'intérieur des sites HindII-BamHI d'un plasmide pBS112 contenant deux sites LoxP (Friedrich et Soriano 1991). Dans le plasmide pPGK-LoxP, le promoteur du gène Pgk1 de la souris (Numéro d'accèsion Genebank M18735) est inséré entre deux sites LoxP. Ce plasmide a été construit en insérant le promoteur de Pgk1 à l'intérieur des sites HindIII-BamHI de pBS112.

#### Exemples 10 : Les souris transgéniques

Les souris transgéniques ont été obtenues par microinjection des chimères linéarisés par PvuI à l'intérieur des oeufs fertilisés selon les techniques bien connues de l'homme du métier (Hogan et al. 1986). L'ADN a été purifié sur des colonnes Qiagen en respectant les instructions du fabricant puis linéarisé, et suspendu à une concentration de 5 ng/ $\mu$ l dans de l'eau stérile avant microinjection. La vérification des animaux transgéniques a été réalisée par Southern et/ou analyse dot blot de l'ADN extrait de la queue des souris. Toutes les familles transgéniques ont été générées et maintenues dans un arrière fond génétique C57BL/6 x DBA/2 F1. Le mutant Rxra <sup>$\Delta$ AP2 (LNL)</sup> possède une cassette LoxP-tk-neo-LoxP, inséré par recombinaison homologue à l'intérieur du 8<sup>ème</sup> intron du gène Rxra (Feil et al. 1996).

#### Exemple 11 : Expression des transgènes Cre

Le niveau des ARNm de Cre a été estimé par analyse reverse transcriptase (RT-PCR). L'isolation de l'ARN à partir du cerveau du foie du rein et des testicules a été réalisée en utilisant une extraction par phénol acide. Les préparations d'ARN total ont été traitées par la DNaseI (purifiées de toute RNase résiduelle) et l'ADNc a été synthétisé pendant 30 minutes à 50°C en utilisant 50 UI de la reverse transcriptase du virus murin de Moloney de la leucémie (Boehringer Mannheim) en utilisant 1 µg d'ARN comme matrice. Il a ensuite été amplifié pendant 35 cycles de PCR en utilisant les amorces Cre1 (5'-TGA TGG ACA TGT TCA GGG ATC-3') (SEQ ID n°4) et Cre2 (5'- CAG CCA CCA GCT TGC ATG A-3') (SEQ ID n°5) constituant un fragment de l'ADNc de Cre de 865 pb.

#### Exemple 12 : Génotypage de la souris

L'extrémité de l'ADN de la souris a été préparée comme décrit dans Hogan et al. 1986 et analysée par hybridation slot blot en utilisant une série de sonde. La sonde Cre peut être obtenue par amplification PCR de tout plasmide qui contient la phase ouverte de lecture complète pour la protéine Cre en utilisant les amorces Cre1 et Cre2. Tous ces fragments ont été purifiés deux fois sur gel d'agarose. Des sondes peuvent également être préparés à partir des séquences du transgène « floxé ».

#### Exemple 13 : Détection de l'excision induite par Cre

L'analyse Southern blot a été réalisée selon les techniques bien connues de l'homme de l'art (Sambrook et al, 1989). L'ADN a été digéré pendant la nuit avec les enzymes de restriction indiqués supra (dix fois en excès). Les fragments d'ADN ont été ensuite soumis à électrophorèse et transférés sur

nitrocellulose. Les hybridations ont été réalisées en utilisant les plasmides pSA $\beta$ geo ou pPK $\beta$ geobpa radiomarqués (Soriano et al, 1991). En plus des "transgènes floxés", les séquences du plasmide pBr322 présentes dans ces chimères permettent la  
5 détection du transgène Cre.

L'analyse des souris double transgéniques portant le vecteur d'expression Cre et l'allèle  $Rxra^{\Delta F2(LNL)}$  a été réalisée par amplification PCR telle que décrite dans Feil et al. 1996. En ce qui concerne la détection de l'allèle  $Rxra^{\Delta F2(LNL)}$ , les  
10 séquences tkneo "floxées" ont été amplifiées en utilisant les amorces 5' et 3', 5'- GGT TCT CCG GCC GCT TGG GT-3' (SEQ ID n°6) et 5'- GGA GGC GAT GCG CTG CGA AT-3' (SEQ ID n°7), respectivement. Pour ce qui est de la détection du transgène Cre, les amorces Cre1 et Cre2 ont été utilisées. La  
15 visualisation de l'excision du marqueur tkneo floxé de l'allèle cible  $Rxra^{\Delta F2(LNL)}$  a été utilisée en utilisant les amorces RXR1 (5'- CCA GGA GCC TCC TTT CTC CA-3') (SEQ ID n°8) et RXR2 (5'- CCT GCT CTA CCT GGT GAC TT-3') (SEQ ID n°9). Ces amorces ont amplifié un fragment de 156 bp à partir de l'allèle  $Rxra$  de  
20 type sauvage et un fragment de 190 bp à partir de l'allèle recombiné  $Rxra^{\Delta F2(L)}$ . Les produits amplifiés ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%.

REFERENCES

- 5    - Albanesi, C., Geremia, R., Giorgio, M., Dolci, S., Sette, C.,  
and Rossi, P. (1996). A cell- and developmental stage-specific  
promoter drives the expression of a truncated c-kit protein  
during mouse spermatid elongation. *Development* 122, 1291-1302.
- 10   - Albert H., Dale E.C., Lee E. and Ow D.W. (1995). *Plant J.* 7 :  
649-659.
- Akagi K, Sandig V, Vooijs M, Van der Valk M, Giovannini M,  
Strauss M, Berns A (1997): Cre-mediated somatic site-specific  
15   recombination in mice. *Nucleic Acids Res* 25:1766-73.
- Bartell, J. G., Davis, T., Kremer, E. J., Dewey, M. J., and  
Kistler, W. S. (1996). Expression of the rat testis-specific  
histone Hlt gene in transgenic mice. One kilobase of 5'-  
20   flanking sequence mediates correct expression of a lacZ fusion  
gene. *J Biol Chem* 271, 4046-4054.
- Bellvé, A.R., Cavicchia, J.C., Millette, C.F., O'Brien, D.A.,  
Bhatnagar, Y.M., and Dym, M. (1977). *J Cell Biol* 74, 68-85.
- 25   - Behringer, R. R., Crotty, D. A., Tennyson, V. M., Brinster,  
R. L., Palmiter, R. D., and Wolgemuth, D. J. (1993). Sequences  
5' of the homeobox of the Hox-1.4 gene direct tissue-specific  
expression of lacZ during mouse development. *Development* 117,  
30   823-833.
- Brocard J, Warot X, Wendling O, Messaddeq N, Vonesch JL,  
Chambon P, Metzger D (1997): Spatio-temporally controlled site-



specific somatic mutagenesis in the mouse. Proc Natl Acad Sci  
USA 94:14559-63.

- Chomczynski P, Saachi N (1987): single-step method of RNA  
5 isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform  
extraction. Anal. Bioch. 162:152-159.
  
- Clermont, Y. (1972). Physiol Rev 52, 198-236.
  
- 10 - Dietrich, A. J. J., Kok, E., Offenberger, H.H., Heyting, C., de  
Boer, P., and Vink, A. C. G. (1992). Genome 35, 492-497.
  
- Dietrich, A. J., and Mulder, R. J. (1983). Chromosoma 88,  
377-85.
  
- 15 - Dix, D.J., Rosario-Herrle, M., Gotoh, H., Mori, C., Goulding,  
E.H., Barrett, C.V., and Eddy, E.M. (1996). Dev Biol 174, 310-  
21.
  
- 20 - Dobson, M.J., Pearlman, R.E., Karauskakis, A., Spyropoulos,  
B., and Moens, P.B. (1994). J Cell Sci 107, 2749-2760.
  
- Dolle P., Fraulob V., Kastner P. and Chambon P. (1994).  
Developmental expression of murine retinoid X receptor (RXR)  
25 genes. Mech. Dev. 45, 91-104.
  
- Dupressoir, A., and Heidmann, T. (1996). Germ line-specific  
expression of intracisternal A-particle retrotransposons in  
transgenic mice. Mol Cell Biol 16, 4495-4503.
  
- 30 - Ewulonu, U.K., Snyder, L., Silver, L.M., and Schimenti, J.C.  
(1996). Mol Reprod Dev 43, 290-7.

- Feil R, Brocard J, MasCrez B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P (1996): Ligand-activated site-specific recombination in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10887-10890.
- 5 - Friedrich G, Soriano P (1991): Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic sScreen to identify and mutate developmental genes in mice. Genes Dev. 5:1513-1523.
- Furuchi, T., Masuko, K., Nishimune, Y., Obinata, M., and  
10 Matsui, Y. (1996). Inhibition of testicular germ cell apoptosis and differentiation in mice misexpressing Bcl-2 in spermatogonia. Development 122, 1703-1709.
- Galli-Taliadoros L. A., Sedwick J. D., Wood S. A., Korner H.  
15 (1995). Gene Knock-out technology : a methodical overview for the interested novice. J. Immunol Methods Apr 12 ; 181(1) : 1-15.
- Goto, M., Masamune, Y., and Nakanishi, Y. (1993). Nucleic  
20 Acids Res 21, 209-14.
- Gowen LC, Johnson BL, Latour AM, Sulik KK, Koller BH (1996): Brcal deficiency results in early embryonic lethality characterized by neuroepithelial abnormalities. Nat Genet  
25 12:191-194.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. (1977). J Gen Virol 36, 59-74.
- 30 - Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K (1994): Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. Science 265:103-6.

- Hergersberg, M., Matsuo, K., Gassmann, M., Schaffner, W., Luscher, B., Rulicke, T., and Aguzzi, A. (1995). Tissue-specific expression of a FMR1/ $\beta$ -galactosidase fusion gene in transgenic mice. Hum Mol Genet 4, 359-366.
- 5
- Heyting, C., Dietrich, A., Moens, P.B., Dettmers, R., Offenberger, H.H., Redeker, E.J., and Vink, A.C. (1989). Genome 31, 81-7.
- 10
- Hoess, R.H., and Abremski, K. (1984). Proc Natl Acad Sci USA 81, 1026-9.
- Hogan B, Costantini F, Lacy L (1986): "Manipulating the mouse embryo - a laboratory manual". Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory.
- 15
- Iannello, R. C., Young, J., Sumarsono, S., Tymms, M.J., Dahl, H. H., Gould, J., Hedger, M., and Kola, I. (1997). Mol Cell Biol 17, 612-9.
- 20
- Ikeshima, H., Shimoda, K., Matsuo, K., Hata. J., Maejima, K., and Takano, T. (1994). Spermatocyte-specific transcription by calmodulin gene II promoter in transgenic mice. Mol Cell Endocrinol 99, 49-53.
- 25
- Kühn R. and Schwenk F. (1997). Advances in gene targeting methods. Curr. Opin. Immunol Apr ; 9(2) : 183-188.
- Kühn R., Schwenk F., Aguet M., Rajewski (1995): Inducible gene targeting in mice. Science 269:1427-1429.
- 30
- Langford, K. G., Shai, S.-Y., Howard, T. E., Kovac, M. J., Overbeek, P. A., and Bernstein, K. E. (1991). Transgenic mice

demonstrate a testis-specific promoter for angiotensin-converting enzyme. J Biol Chem 266, 15559-15562.

- 5     - Li, Y. C., Hayes, S., and Young, A.P. (1994). Gene 138, 257-8.
- McLaren, A., and Southee, D. (1997). Dev Biol 187, 107-13.
- 10    - Mertineit, C., Yoder, J.A., Taketo, T., Laird, D.W., Trasler, J. M., and Bestor, T.H. (1998). Development 125, 889-897.
- Mettus, R. V., Litvin, J., Wali, A., Toscani, A., Latham, K., Hatton, K., and Reddy, E.P. (1994). Oncogene 9, 3077-86.
- 15    - Meuwissen RLJ, Offenberg HH, Dietrich AJJ, Riesewijk A, van Iersel M, Heyting C (1992): A coiled protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. EMBO J. 11:5091-5100.
- 20    - Moens, P.B., Spyropoulos, B., Dobson, M., Karaiskakis, A., and Pearlman, R.E. (1992). Dev Genet 13, 435-9.
- Mountford P., Zevnik B., Duwel A., Nichols J., Li M., Dani C., Robertson M., Chambers I., and Smith A. (1994). Dicistronic  
25    trageting constructs: reporters and modifiers of mammalian gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 4303-4307.
- Nayernia, K., Nieter, S., Kremling, H., Oberwinkler, H., and Engel, W. (1994). Functional and molecular characterization of  
30    the transcriptional regulatory region of the proacrosin gene. J Biol Chem 269, 32181-32186.

- Offenberg, H. H., Dietrich, A. J., and Heyting, C. (1991).  
Chromosoma 101, 83-91.

5 - O'Gorman S, Dagenais NA, Qian M, Marchuk Y (1997): Protamine-  
Cre recombinase transgenes efficiently recombine target  
sequences in the male germ line of mice, but not in embryonic  
stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:14602-14607.

10 - Peschon, J. J., Behringer, R. R., Brinster, R. L., and  
Palmiter, R. D. (1987). Spermatid-specific expression of  
protamine 1 in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A 84,  
5316-5319.

15 - Porter A (1998): Controlling your losses: conditional gene  
silencing in mammals. Trends Genet. 14:73-79.

20 - Rassoulzadegan, M., Paquis-Flucklinger, V., Bertino, B.,  
Sage, J., Jasin, M., Miyagawa, K., van Heyningen, V., Besmer,  
P., and Cuzin, F. (1993). Cell 75, 997-1006.

25 - Robinson, M. O., McCarrey, J. R., and Simon, M. I. (1989).  
Transcriptional regulatory regions of testis-specific PGK2  
defined in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A 86, 8438-  
8441.

30 - Sage J, Yuan L, Martin L, Mattei M, Guénet J-L, Liu J-G, Hoög  
C, Rassoulzadegan M, Cuzin F (1997): The Scpl loci of the mouse  
genome: successive retropositions of an meiotic gene during the  
recent evolution of the genus. Genomics 44:118-126.

- Sage, J., Martin, L., Cuzin, F., and Rassoulzadegan, M.  
(1995). Biochim Biophys Acta 1263, 258-60.

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989): "Molecular cloning: a laboratory manual" 2<sup>nd</sup> Ed.. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory.
- 5 - Sauer B, Henderson N (1989): Cre-stimulated recombination at loxP-containing DNA sequences placed into the mammalian genome. Nucleic Acids Res 17:147-61.
- Sauer B, Henderson N (1990): targeted insertion of exogenous  
10 DNA into the eukaryotic genome by the Cre recombinase. New Biol 2:441-9.
- Scherthan, H., Weich, S., Schwegler, H., Heyting, C., Harle, M., and Cremer, T. (1996). J Cell Biol 134, 1109-25.
- 15 - Shaper, N.L., Harduin, L.A., and Shaper, J.H. (1994). J Biol Chem 269, 25165-25171.
- Smale, S.T., and Baltimore, D. (1989). Cell 57, 103-13.
- 20 - Soriano P., Friedrich G. and Lawinger P. J. (1991). Virol. 65 : 2314-2319.
- Toscani, A., Mettus, R.V., Coupland, R., Simpkins, H.,  
25 Litvin, J., Orth, J., Hatton, K. S., and Reddy, E.P. (1997). Nature 386, 713-7.
- Vidal, F., Sage, J., Cuzin, F., and Rassoulzadegan, M. (1998). Mol Reprod Dev, in press.
- 30 - Wagner KU, Wall RJ, St Onge L, Gruss P, Wynshaw BA, Garrett L, Li M, Furth PA, Hennighausen L (1997): Cre-mediated gene deletion in the mammary gland. Nucleic Acids Res 25:4323-30.

- Widlak, W., Markkula, M., Krawczyk, Z., Kananen, K., and Huhtaniemi, I. (1995).

5 A 252 bp upstream region of the rat spermatocyte-specific hst70 gene is sufficient to promote expression of the hst70-CAT hybrid gene in testis and brain of transgenic mice. Biochim Biophys Acta 1264, 191-200.

10 - Yuspa, S.H., Hamley-Nelson, P., Koehler, B., Stanley, J.R. (1980). Cancer Res. 40, 4694-4703.

- Zabludoff SD, Wright WW, Harshman K, Wold BJ (1996): BRCA1 mRNA is expressed highly during meiosis and spermiogenesis but not during mitosis of male germ cells. Oncogene 13:649-653.

15

- Zambrowicz, B. P., and Palmiter, R. D. (1994). Testis-specific and ubiquitous proteins bind to functionally important regions of the mouse protamine-1 promoter. Biology of Reproduction 50, 65-72.

20

25

## LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

- (i) DEPOSANT:  
 (A) NOM: INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA  
 RECHERCHE MEDICALE (INSERM)  
 (B) RUE: 101, RUE DE TOLBIAC  
 (C) VILLE: PARIS  
 (E) PAYS: FRANCE  
 (F) CODE POSTAL: 75654 CEDEX 13
- (ii) TITRE DE L' INVENTION: PROCEDE POUR REMODELER LE GENOME D'UN ANIMAL  
 PAR TRANSFERT ZYGOTIQUE D'UNE RECOMBINASE DE SITE  
 SPECIFIQUE
- (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 9
- (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:  
 (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk  
 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible  
 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS  
 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 392 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:  
 NOM/CLE: -260/+5 souris

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

CATCCACATG AAACACTCTA TAACACGCAC CAGAACATAA TAAATACAGC CTTGAAAAGG	60
AAAGCACTGA GACGCCTTTA AATGGCTATA CACCAACGAG GGGGTTGGGG GGGGGCTTTC	120
CCAGCATCCT CCGACAATTT TGAGCGCAGA CTTGGTAGAG AACCCGGCAC GTGGAAGGAA	180
ATCTCGCGAG AAGTCGTGCG CGCAGAGATC CCGGCCAGCT GGACCAACCG TTAAATTGAG	240
CCGGTCGCGG CCAGCCTCCC AGTCC	265



(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 392 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:  
NOM/CLE: -316/+5 rat

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

CATTCACACG AAATACTCAA TAACACAAAC CAGAAAGTAA TAAATCATTA AAAAAAGAAA	60
GAAGGAAAGA AATGAGACTC CTTTAAATGG CTATAAGCCA ATGTGATAGT TGGACGTAA	120
GGTTGTGAGC GCCTCAGCTC TTTTGTCTGA GCACCAGCCA GGAAAGCTTT CCCAGAGTCC	180
TCTGACAATT CTGACTGCAG AGTTGGTGGA GAATCAGAAC TCGGCCCCGT GGAAGGGAA	240
ATCCCGCGAG AAGTGTGCAC GAGATCCCGG CCAGCTGGAT CAACGGTTAA ATTTAGCCAG	300
TACAGCCCAG CTGCCAGTC C	321

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 186 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:  
NOM/CLE: -54/+5 souris

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

GATCCCGGCC AGCTGGACCA ACCGTTAAAT TGAGCCGGTC GCGGCCAGCC TCCCAGTCC

59

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 21 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:  
NOM/CLE: amorce Cre1

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

TGATGGACAT GTTCAGGGAT C

21

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 19 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:  
NOM/CLE: amorce Cre2

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

CAGCCACCAG CTTGCATGA

19

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:  
NOM/CLE: amorce 5'

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

GGTTCTCCGG CCGCTTGGGT

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:  
NOM/CLE: amorce 3'

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

GGAGGCGATG CGCTGCGAAT

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 20 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

CCAGGAGCCT CCTTTCTCCA

20

(ix) CARACTERISTIQUE:  
NOM/CLE: amorce RXR1

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 20 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:  
NOM/CLE: amorce RXR2

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

CCTGCTCTAC CTGGTGACTT

20

### REVENDEICATIONS

1. Procédé pour transférer dans un oocyte une protéine  
5 d'intérêt, qui possède une forte affinité pour L'ADN, sous  
sa forme active, caractérisé en ce qu'il comporte les  
étapes suivantes :
  - a) Expression dans les cellules germinales mâles d'une  
protéine possédant une forte affinité pour L'ADN, ladite  
10 protéine restant associée à la chromatine des  
spermatozoïdes.
  - b) Fertilisation des oocytes et transfère de la protéine par  
lesdits spermatozoïdes.
  - a) Libération de la protéine sous sa forme active lors de la  
15 décondensation de la chromatine après la fécondation.
2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que ledit  
gène d'intérêt est un gène codant pour une recombinaise  
spécifique de site.  
20
3. Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce que la  
recombinaise est Cre.
4. Procédé d'insertion d'une séquence étrangère dans le génome  
25 d'un animal comprenant les étapes suivantes :
  - a) Expression d'une recombinaise spécifique de site dans les  
cellules germinales d'un mâle portant au moins un site  
spécifique dans son génome, ladite recombinaise restant  
30 associée à la chromatine des spermatozoïdes.
  - b) Fertilisation des oocytes et transfert de la recombinaise par  
lesdits spermatozoïdes.

- c) Microinjection d'un ADN recombinant possédant la structure « site spécifique-séquence étrangère » dans le pronucleus mâle après fécondation.
- 5 d) Insertion de ladite séquence étrangère au site spécifique dans le génome de l'embryon au stade 1 cellule, catalysée par la recombinaise libérée lors de la décondensation de la chromatine du spermatozoïde.
- 10 5. Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que ladite séquence étrangère comporte un gène d'intérêt, à exprimer sous le contrôle d'un promoteur éventuellement tissu(s) spécifique(s).
- 15 6. Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que ladite séquence étrangère comporte un gène rapporteur fusionné à un promoteur d'intérêt.
- 20 7. Procédé selon l'une des revendications 6 caractérisé en ce que ladite séquence étrangère comporte en outre un élément accepteur d'épissage (SA), une séquence IRES et/ou un signal de polyadénylation.
- 25 8. Procédé de remplacement d'une séquence X par une séquence Y dans le génome d'un animal caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- 30 a) Expression d'une recombinaise spécifique de site dans les cellules germinales d'un mâle portant une structure « site spécifique-séquence X-site spécifique » dans son génome, ladite recombinaise restant associée à la chromatine des spermatozoïdes.

- b) Excision de la séquence X lors de la spermatogénèse par la recombinaise.
  - c) Fertilisation des oocytes et transfert de la recombinaise par lesdits spermatozoïdes.
  - 5 d) Microinjection d'un ADN recombinant possédant la structure « site spécifique- séquence Y -site spécifique » dans le pronucleus mâle après fécondation.
  - e) Insertion de la séquence Y au site spécifique dans le génome de l'embryon au stade 1 cellule, catalysée par la  
10 recombinaise libérée lors de la décondensation de la chromatine du spermatozoïde.
9. Procédé de remplacement d'une séquence X par une séquence Y dans le génome d'un animal caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- 15 a) Expression d'une recombinaise spécifique de site dans les cellules germinales d'un mâle portant une structure « site spécifique-séquence X-site spécifique » dans son génome, ladite recombinaise restant associée à la chromatine des spermatozoïdes.
  - 20 b) croisement dudit mâle avec une femelle possédant la structure « site spécifique- séquence Y -site spécifique » dans son génome, ladite recombinaise catalysant la recombinaison entre sites spécifiques.
- 25 10. Procédé selon l'une des revendications 4 à 9 caractérisé en ce que ladite recombinaise est Cre et ledit site spécifique est un site LoxP, ou un variant ou un mutant de la séquence LoxP.
- 30 11. Procédé selon l'une des revendications 4 à 10 caractérisé en ce que ladite recombinaise est exprimée sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression efficace dans les spermatocytes d'un mammifère.

12. Procédé selon la revendication 11 caractérisé en ce que  
ledit promoteur comporte au moins une région du promoteur  
Sycp1, EF-1alpha, IAP, FRM1', Pdha-2, Hsp70-2, CamII, H1t,  $\beta$ 4-  
Gtase, Zfy1', Tcp-10bt, Pgk-2, Hst70, Hox-a.4', Proacrosin, c-  
5 Kit, ACE ou Prm-1.
13. Procédé selon la revendication 12 caractérisé en ce que  
ledit promoteur comporte au moins une séquence ayant au moins  
10 80 % d'identité la région du promoteur Sycp1 de séquence SEQ  
ID n°1.
14. Animal transgénique susceptible d'être obtenu par le  
procédé selon l'une des revendications 4 à 13.
- 15 15. Séquence nucléotidique permettant de promouvoir  
efficacement l'expression d'un gène d'intérêt pendant la  
première phase méiotique des spermatocytes d'un mammifère  
caractérisée en ce qu'elle comporte au moins une séquence ayant  
20 au moins 80 % d'identité avec la séquence SEQ ID n°1.
16. Séquence nucléotidique selon la revendication 15  
caractérisée en ce qu'elle comporte au moins la séquence SEQ ID  
n°1 ou SEQ ID n°2.
- 25 17. Séquence nucléotidique comprenant au moins une séquence  
selon l'une des revendications 15 à 16 fusionnée à une  
séquence codante pour un gène d'intérêt.
- 30 18. Séquence nucléotidique selon la revendication 17  
caractérisée en ce que ledit gène d'intérêt est un gène codant  
pour une recombinaise spécifique de site.



19. Séquence nucléotidique selon la revendication 18 caractérisée en ce que ladite recombinaise est Cre.
- 5 20. Molécule d'ADN comportant au moins une séquence selon l'une des revendications 17 à 19 caractérisée en ce qu'elle se trouve sous la forme d'un plasmide, d'un vecteur viral, d'un pseudo-vecteur, ou d'un ADN nu linéaire ou circulaire.
- 10 21. Animal transgénique contenant dans son génome une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 17 à 19 permettant l'expression d'un gène d'intérêt spécifiquement dans les spermatoocytes.
- 15 22. Animal selon la revendication 21 caractérisé en ce que le gène d'intérêt est une recombinaise spécifique de site.
23. Animal selon la revendication 22 caractérisé en ce que la recombinaise est Cre.
- 20 24. Animal selon l'une des revendications 22 et 23 caractérisé en ce que la recombinaise demeure associée à la chromatine des spermatozoïdes.
- 25 25. Utilisation d'un animal selon la revendication 24 dans le procédé des revendications 4, 8, et 9.
- 30 26. Procédé de recombinaison entre chromosomes paternels et maternels caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes : a) Expression d'une recombinaise spécifique de site dans les cellules germinales d'un mâle portant dans son génome un ou plusieurs site(s) spécifique(s), b) on croise un ledit mâle avec un animal femelle portant dans son génome un ou plusieurs site(s) spécifique(s), ladite recombinaise catalysant la recombinaison entre sites spécifiques lors de la première phase de la méiose.

27. Animal susceptible d'être obtenu par le procédé selon la revendication 26.
28. Animal multi transgénique obtenu en croisant entre eux les  
5 animaux selon l'une des revendications 14 et 27.
29. Animal transgénique selon l'une des revendications 14, 27  
et 28 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un mammifère,  
notamment sélectionné parmi les ovins, les porcins, les  
10 bovins, les rongeurs.
30. Utilisation d'un animal selon la revendication 29 pour la  
préparation de substances utiles en médecine, en cosmétique,  
et/ou en agro-alimentaire, notamment de substances actives,  
15 de préférence des peptides ou polypeptides, des anticorps,  
des antigènes, des hormones, ou des facteurs de croissance,  
et/ou pour la fabrication de suppléments alimentaires.
31. Utilisation d'un animal selon la revendication 29 comme  
20 modèle expérimental pour l'identification de gènes, de  
promoteur, de protéines, notamment de gènes impliqués dans  
les maladies génétiques, et/ou pour tester l'action de  
substances actives.
- 25 32. Utilisation d'un animal selon la revendication 29 pour la  
préparation d'organes ou de cellules présentant une meilleur  
immunocompatibilité avec les humains que les organes ou  
cellules de type sauvage ou susceptibles d'avoir un faible  
taux de rejet par les défenses immunitaires des humains.  
30
33. Utilisation d'un animal selon la revendication 29 pour  
l'élevage.

1/15

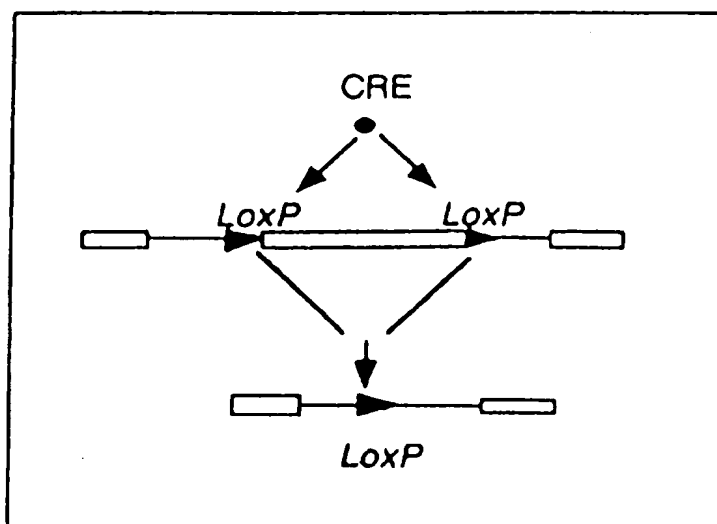


Fig. 1A

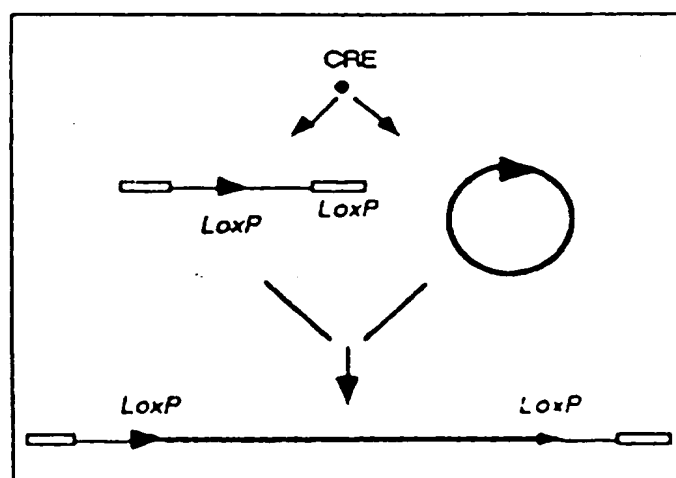


Fig. 1B

2/15

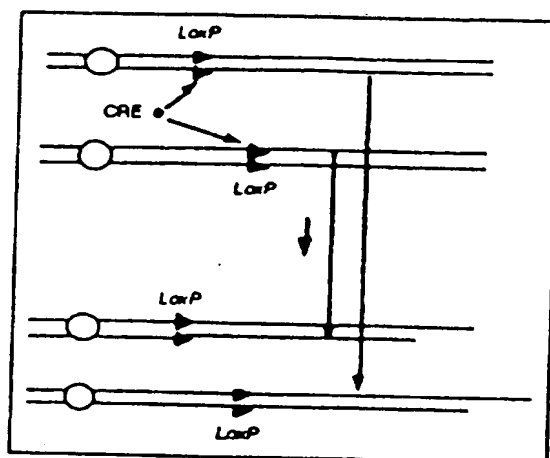


Figure 2

3/15

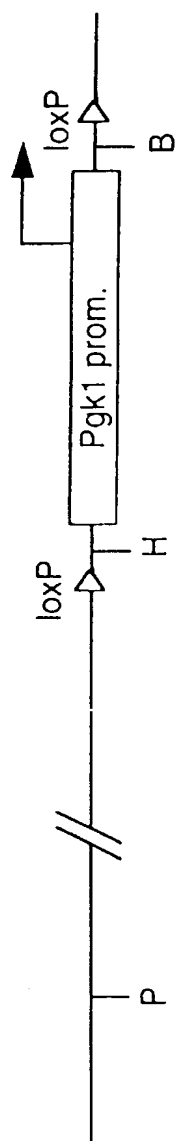


Fig. 3A



Fig. 3D

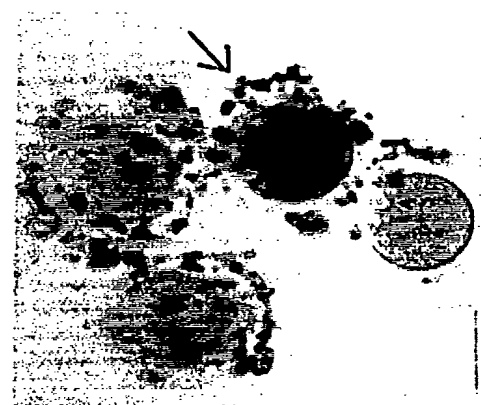


Fig. 3C

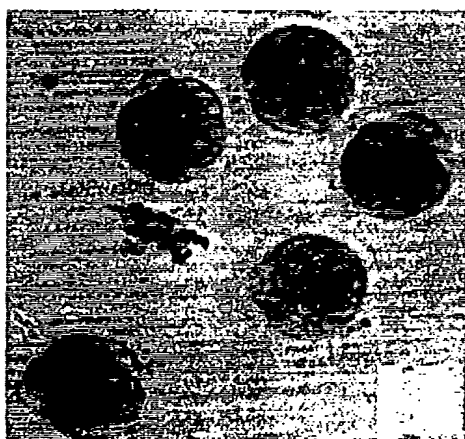


Fig. 3B

BEST AVAILABLE COPY

4/15

Fig. 4A

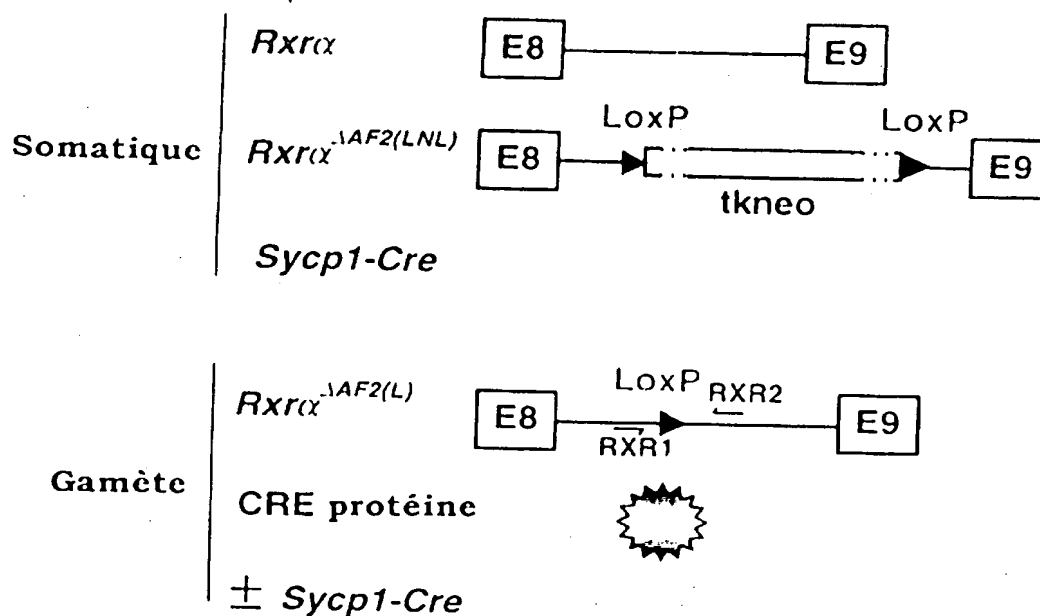
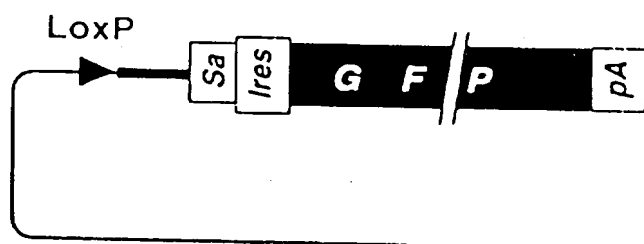


Fig. 4B



5/15

Fig. 4C

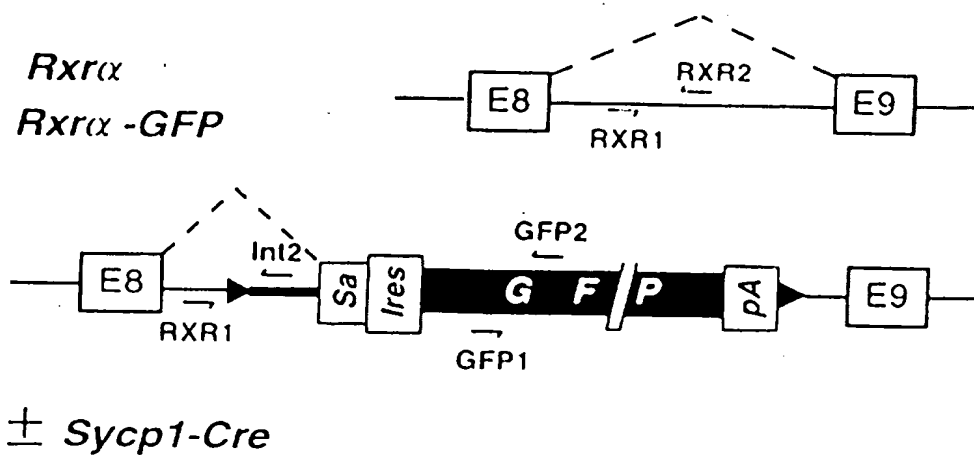
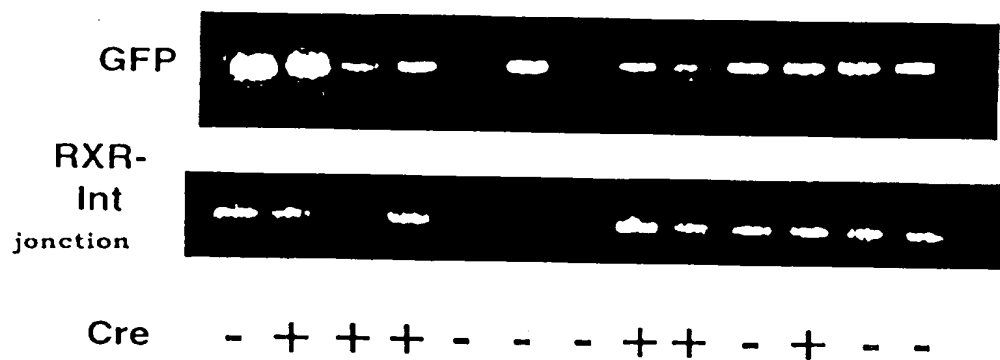


Fig. 4D



6/15

Fig. 5A

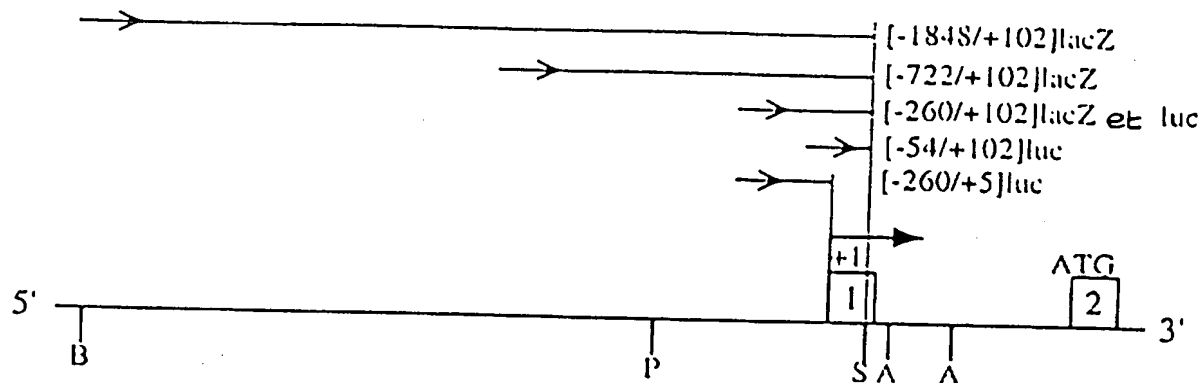


Fig. 5B

M GGCTCCTACTCC...TTATGGATGCCCAAGCGAAGCGCTGCAGCGTGGTGAC...GGGTTGATCGATACATCCA  
 R GGATCCTACTCCCCGTTATGCCGCCCCAGG...ACACTGCA.CGTGGTGACATGTGTACGCACATACATTCA

CATGAACACTCTATACACGCCACCAGAACATAATAAT...ACAGCCTTGAAAAGCAAAGCACTGAGACGCC  
 CACGAATACTCAATAACACAAACCAGAAAGTAATAAATCATTAAAAAGAAAGAAAGAAATGAGACTCC

TTTAAATGGCTATACACCAACG/ **AP-2** GGGCTTGGG.....  
 TTTAAATGGCTATAAAGCAATGTGATAGTTGGACGTTAAGGTTGTGAGCGCCCTCAGCTCTTTTGTCTGAGCACCA

**NF-kB**  
 ....G GGGCTTTC CAGCATCTCTCCGACAATTTTGAGCGCAGACTTGGTAG.....AGAACCCGGCAC...G

GCCAGGAAGCTTTCCAGAGTCTCTGACAATTTCTGACTGCAGAGTTGGTGAGAAATCAGAACTC GGCCCGTG

TGGAAGGAAATCTCCGAGAAAGTGTGTCGCCCGCAGATCTCCCGG CAGCTG ACCA/ CCGTT AATTGAGCCCGTC  
 GGAAC GAAATCCCT CGAGAAGT.GTGAC...GAGATCCCGG CAGCTG GAT AACTG TAAATTTAGCCAGTA

**NF-kB**  
 GCGGCCAGCCTCCCAGTCCCGCGAGTCTCTCGGGCTTCCAGGAGGTTCTGAGG.GGAAGCTCAGGTTTCCGTTCCA  
 CAGCCCAGCTGCCAGTCCCG.GTGTTCTCGGGCTTCTAGGAGGTTCTGAGGAGGCTCTCAGTCTCATTCGA

**+102**  
 TGTCGTTCTATAAAGGAGCGCAGCGCGCCACGGGCGCGGAGCCTGACAACGGTGAGGGTGTGGAGCGGTGT.  
 T...GTCTTCATAAAGAAGCGCTCC...GGGCACGGAGCCTGCCATCGGTGAGCGGTGTGGAGCGGTTC

CCGGCCCTGGGGCCACGTACACACCTCTGTACAGCGTGTCCAGGTGCTTGGCTTCGGCGGGCTTCGC.GGCCAGGG  
 CCGGGCCAGGGCCACGTGGCAGCTCTGTACAGCATGTCCGGGTGCTTGGCTTCGGCGGGCTTCTCGGGCCAGGG

AGGCCCGGGCTGGGCTCAGGCTGTTCGGGGCGGCTTCGAGGTTGGGCTTTCTGGCTGGG  
 AGCCAGGCTTGGGCTCAGGCTGTTCGAGGCGGCTTCGAGGTTGGGCTTTCTGGGCTGGG



7/15

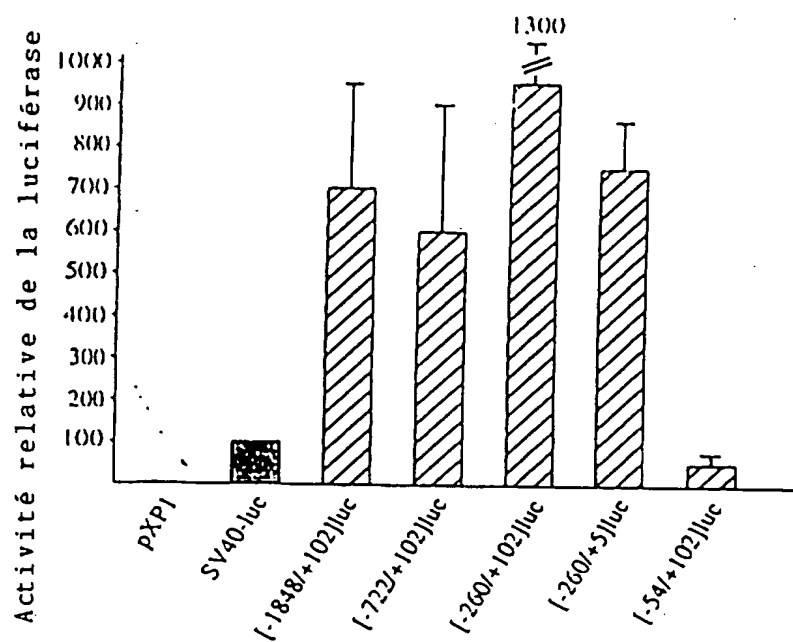


Figure 6

8/15

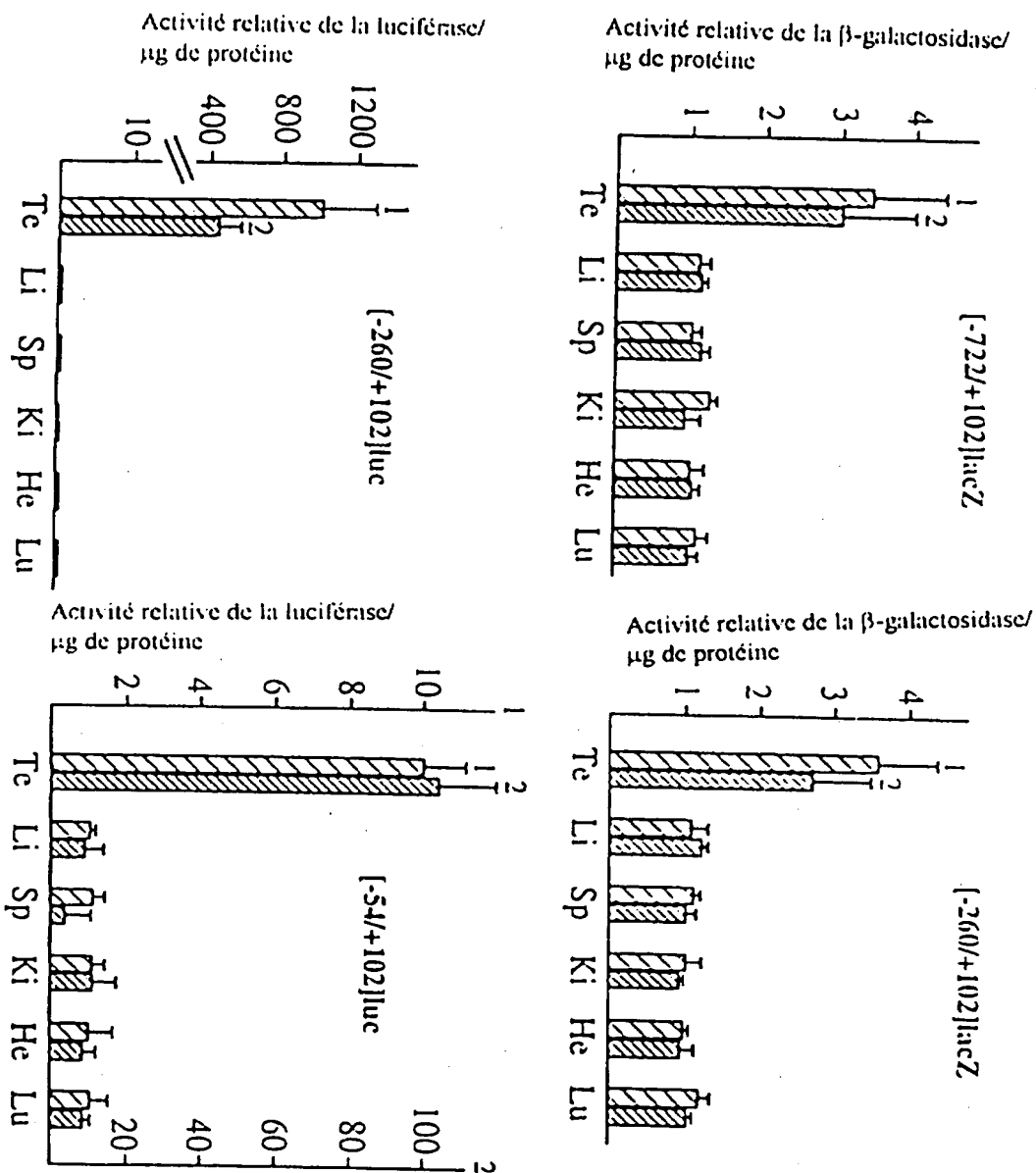


Figure 7

9/15

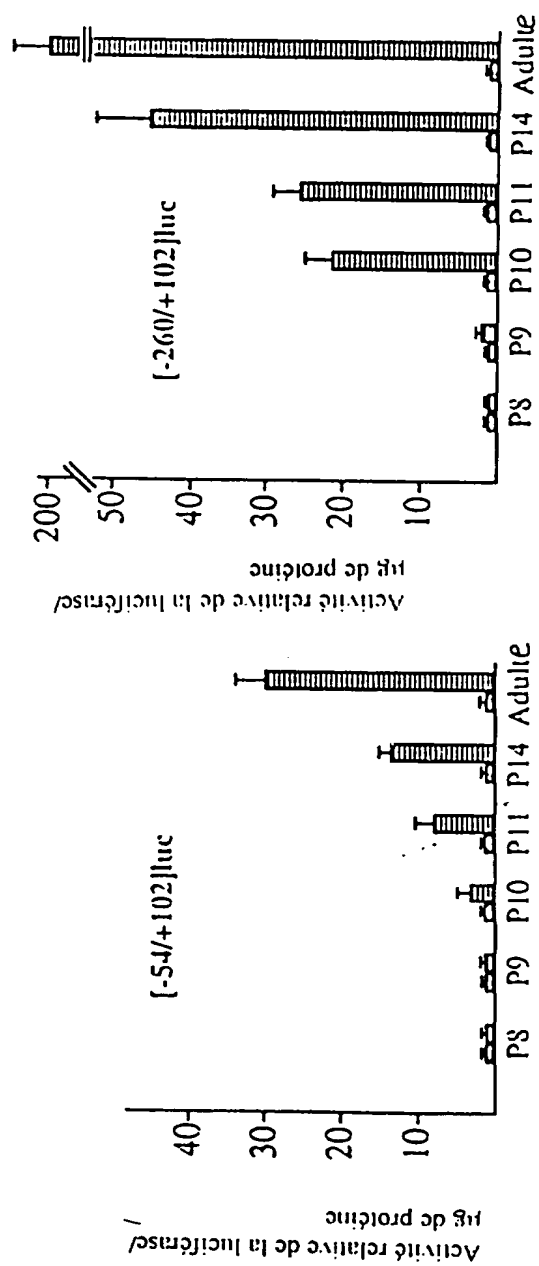
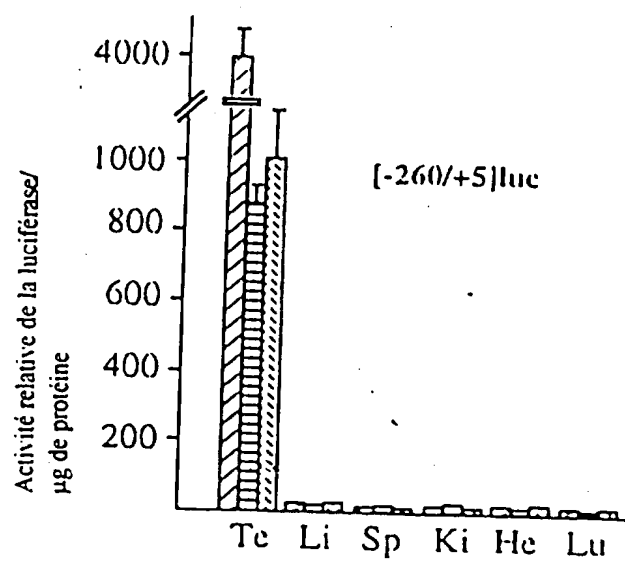


Figure 8

10/15

**Figure 9**

11/15

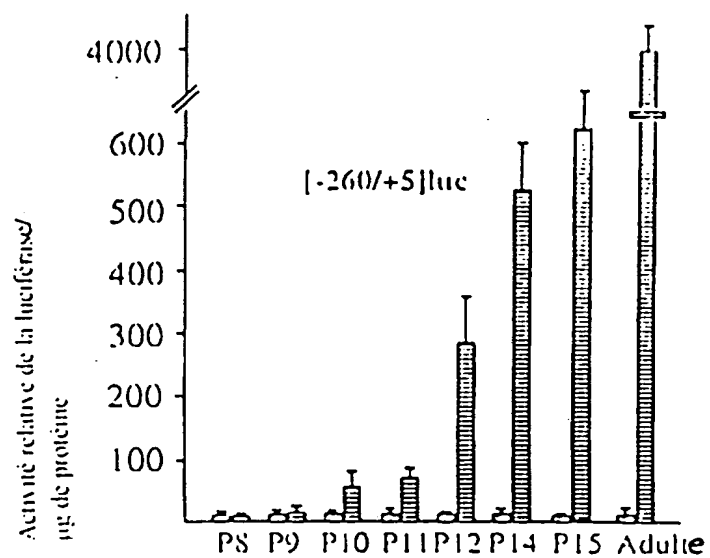


Figure 10

12/15

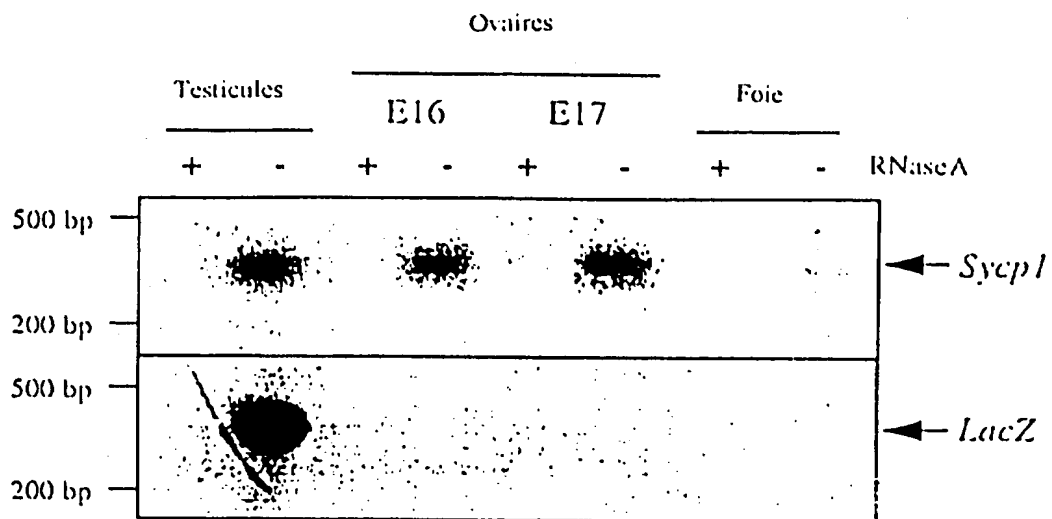


Figure 11

13/15

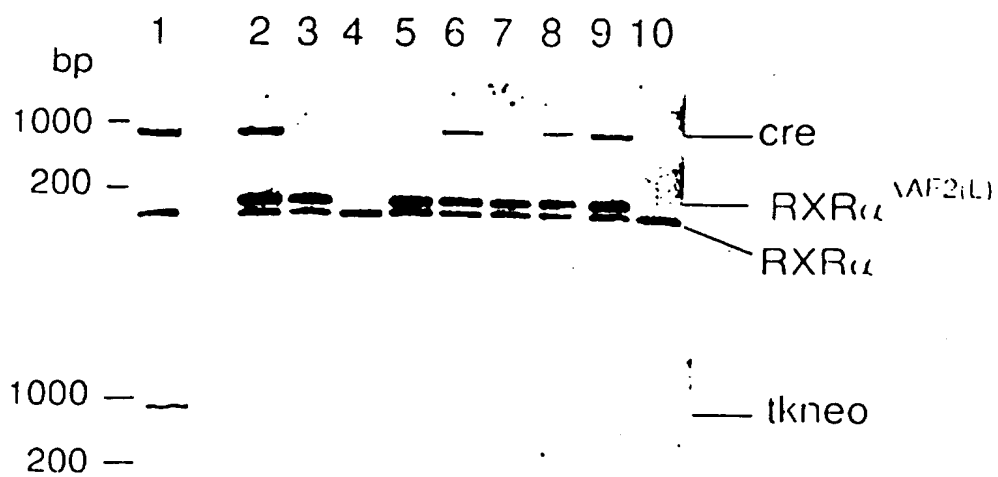


Figure 12

14/15

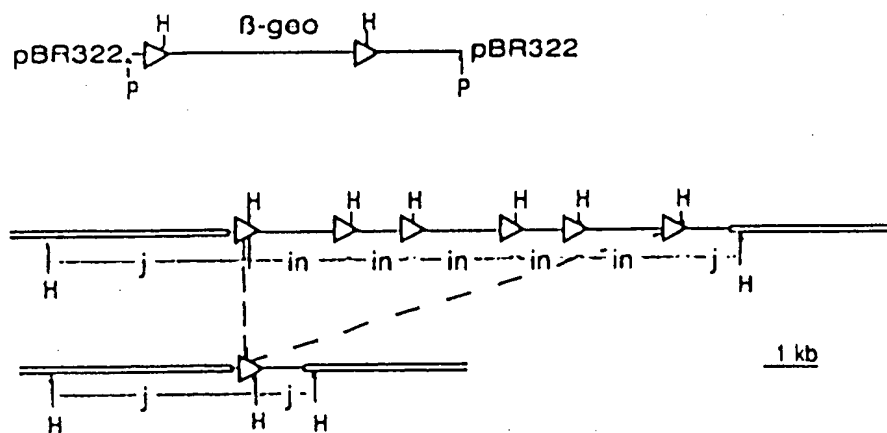


Figure 13



15/15

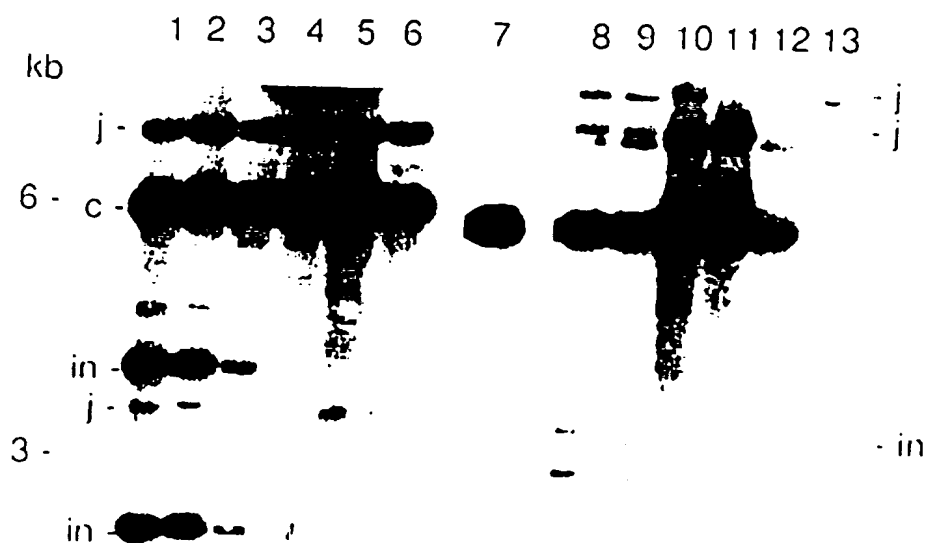


Figure 14

BEST AVAILABLE COPY

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 565617  
FR 9810841

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,X	O'GORMAN S ET AL: "Protamine-Cre recombinase transgenes efficiently recombine target sequences in the male germ line of mice, but not in embryonic stem cells" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol. 94, no. 26, 23 décembre 1997, pages 14602-14607, XP002103928 * page 14604, colonne 2, ligne 15 - ligne 18 *	1-3
D,X	SAGE J ET AL: "The Sycp1 loci of the mouse genome: successive retropositions of a meiotic gene during the recent evolution of the genus." GENOMICS, vol. 44, no. 1, 15 août 1997, pages 118-126, XP002103929 * figure 1 *	15-17,20
E	WO 99 10488 A (WAHL GEOFFREY ; GORMAN STEPHEN O (US); SALK INST FOR BIOLOGICAL STU) 4 mars 1999 * page 24, ligne 29 - ligne 32 *	1-3
A	SAKAI K AND MIYAZAKI JI: "A transgenic mouse line that retains Cre recombinase activity in mature oocytes irrespective of the cre transgene transmission." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS., vol. 237, no. 2, 18 août 1997, pages 318-324, XP002103930	
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C12N A01K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
27 mai 1999		Lonnoy, O
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)